

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ROSSANA CALEGARI DOS SANTOS

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES E SÍNTESE DE  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA UTILIZANDO A *ARCHAEA Halorubrum  
saccharovorum***

CURITIBA  
2016

ROSSANA CALEGARI DOS SANTOS

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES E SÍNTESE DE  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA UTILIZANDO A *ARCHAEA Halorubrum*  
*saccharovorum***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tania M. Bordin Bonfim  
Dr. Luciano Paulino da Silva

CURITIBA  
2016

## TERMO DE APROVAÇÃO

**ROSSANA CALEGARI DOS SANTOS**

**Título: "Otimização da produção de carotenoides e síntese de nanopartículas de prata utilizando a *Archaea Halorubrum saccharovorum*"**


Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.

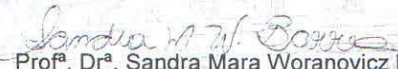
  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tania Maria Bordin Bonfim  
Orientadora

  
Dr. Luciano Paulino da Silva  
Co-orientador

  
Prof. Dr. Dile Pontarolo Stremel  
Universidade Federal do Paraná

  
Prof. Dr. José Domingos Fontana  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

  
Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho  
Universidade Federal do Paraná

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Mara Woranovicz Barreira  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 31 de outubro de 2016.

A presente tese é resultado do acordo cooperativo, que entre si celebraram a Universidade Federal do Paraná (UFPR) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) junto à unidade Recursos Genéticos e Biotecnologia de Brasília, Distrito Federal.

Ao meu amado marido Ricardo,  
Aos meus queridos pais, Eunice e Reginaldo,  
pelo apoio e incentivo incondicionais.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela minha vida, pela minha família, pelos meus amigos e por ter colocado no meu caminho pessoas que tornaram possível a realização e a conclusão desta tese.

Ao meu amado marido Ricardo Alexandre Diogo que não permitiu que o desânimo e o desespero invadissem alguns momentos da minha vida. Obrigada por cuidar de mim, acreditar em mim, incentivar-me, apoiar-me em todos os momentos, divertir-me, entender a minha ausência em alguns momentos e assumir as atividades domésticas! Obrigada “simplesmente” por existir em minha vida!

À minha mãe, Eunice Calegari dos Santos. Obrigada por não ter permitido que eu desanimasse, por ter me encorajado e me apoiado tanto sempre, por compreender a minha ausência em tantos momentos, por ter me distraído nos momentos difíceis, por ser minha companheira para todas as horas, minha amiga, minha conselheira!

Ao meu pai, Reginaldo Chaves dos Santos, pelo apoio, pelas brincadeiras, sempre buscando me distrair.

Ao meu irmão Reginaldo Chaves dos Santos Segundo. Obrigada pela sua presença sempre e pelas palavras de incentivo.

Aos meus sobrinhos, Miguel, Eduardo e Letícia. A presença de vocês me alegra sempre!

A todos os familiares e amigos, pelo carinho e torcida pelo sucesso deste trabalho.

À minha orientadora, professora Tania Maria Bordin Bonfim. Graças a você esta tese teve início e fim! Obrigada por tantas orientações para o trabalho e para a vida, por tanto conhecimento compartilhado, por acreditar em mim, incentivar-me, apoiar-me!

Ao meu coorientador, Luciano Paulino da Silva, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por ter me recebido em Brasília para a realização dos experimentos de nanopartículas de prata, por ter me orientado a distância e por ter me proporcionado tanto conhecimento.

Ao professor Ângelo Márcio Oliveira Sant’Anna, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pelo auxílio na interpretação dos resultados dos experimentos de otimização da produção de carotenoides.

Aos professores da banca de avaliação desta tese, Prof. Dr. Dile Pontarolo Stremel, Prof. Dr. José Domingos Fontana, Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Mara Woranovicz Barreira, pela leitura da tese e pelas preciosas contribuições e sugestões para este trabalho.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Fernanda Gaensly, Thais Martins Guimarães de Francisco, Paola Augusta Yaegashi Paludo, Flávia Deffert, Kamilla Louise Schneider, Camila Chevonica Vandresen; e da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cínthia Caetano Bonatto e Ivy Garcez Reis, pelos conhecimentos compartilhados, pelas palavras de incentivo, pelo convívio, pela amizade, pelas brincadeiras e risadas.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná e a todos os professores pela oportunidade da realização do mestrado e do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

**José de Alencar**



## RESUMO

As *Archaea* halofílicas podem ser empregadas em diversos processos industriais para a obtenção de proteínas, polissacarídeos, poliésteres e lipídios, como os pigmentos carotenoides. Os carotenoides apresentam inúmeros benefícios à saúde humana e podem ser utilizados como corantes e antioxidantes nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética. Para que os carotenoides de *Archaea* halofílicas apresentem potencial biotecnológico, alternativas para a diminuição dos custos de produção devem ser utilizadas, como o aumento do rendimento dos carotenoides por meio da otimização das condições de cultivo visto que fatores nutricionais e físicos durante o cultivo podem influenciar na produção de carotenoides. Assim como os carotenoides, as nanopartículas de prata têm sido alvo de várias pesquisas especialmente devido ao seu espectro de aplicações como antimicrobiano. A obtenção de nanopartículas de prata por rotas de síntese verde, empregando extratos de plantas, leveduras, fungos e bactérias tem se destacado em virtude da diminuição e/ou eliminação do uso e formação de subprodutos tóxicos e da possibilidade de otimização da síntese pela modificação das condições de cultivo e técnicas de extração. Desta forma, a concentração de cloreto de sódio, o pH e a temperatura de cultivo da *Archaea* halofílica *Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) foram otimizados por meio da metodologia de superfície de resposta, visando a maximização da produção de células e de carotenoides, e nanopartículas de prata foram sintetizadas a partir dos extratos de células frescas e secas. A maior concentração celular de  $4,42 \pm 0,56 \text{ g.L}^{-1}$  e a maior concentração de carotenoides totais de  $670,27 \pm 19,62 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$  de células secas foram obtidas empregando, respectivamente, as concentrações de cloreto de sódio de 26,4% e 9,6 % (p/v), valores de pH iniciais de 9,2 e 6,7 e temperaturas de 50,1 °C e 35,8 °C. Com a estratégia de otimização, houve aumento de 2,7 vezes no crescimento da *Archaea* e 8,7 vezes na produção de carotenoides. O emprego dos extratos de células frescas e secas da *Archaea* permitiram a síntese e a estabilização de nanopartículas de prata esféricas com dimensões de 8,82 a 32,09 nm e 22,35 a 55,27 nm, respectivamente, apresentando tamanhos homogêneos, cargas negativas e moderada estabilidade coloidal. Portanto, a *Archaea Halorubrum saccharovorum* pode ser considerada como uma fonte alternativa para a produção de carotenoides e síntese de nanopartículas de prata.

Palavras-chave: *Archaea*. Carotenoides. Planejamento. Nanoestruturas. Halofílico.

## ABSTRACT

Halophilic archaea may be used in different industrial processes for production of proteins, polysaccharides, polyesters and lipids, as carotenoid pigments. Carotenoids present benefit to human health and may be employed as colorants and antioxidants in pharmaceutical, food and cosmetic industries. Costs of carotenoid production by halophilic archaea may be reduced to justify their biotechnological potential. The increase of carotenoid yield is one of the alternatives to costs minimization and may be achieved by the optimization of culture conditions since nutritional and physical conditions may influence carotenoid production. Such as carotenoids, silver nanoparticles have received great attention because of their action as antimicrobial. Silver nanoparticles achievement through green synthesis, employing plant extracts, yeasts, fungi and bacteria, have become more common because it reduces or eliminate the use and formation of toxic byproducts and enables synthesis optimization through changes in culture condition and extraction techniques. Culture conditions (sodium chloride concentration, initial pH value and temperature) of the halophilic archaea *Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) were optimized through response surface methodology to maximize cell and carotenoid production. Additionally, silver nanoparticles were synthesized using extracts of fresh and dried *Halorubrum saccharovorum* cells. The highest cell concentration of  $4.42 \pm 0.56 \text{ g.L}^{-1}$  and total carotenoid concentration of  $670.27 \pm 19.62 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$  were achieved in sodium chloride concentrations of 26.4% e 9.6% (p/v), initial pH values of 9.2 and 6.7 and temperatures of 50.1 °C and 35.8 °C, respectively, or rather, an enhancement of 2.7 and 8.7-fold on the cell and carotenoid production. Extracts of fresh and dried archaea cells allowed the synthesis and stabilization of spherical silver nanoparticles of 8.82 to 32.09 nm and 22.35 to 55.27 nm, respectively. The nanoparticles presented uniform sizes, negative charges and moderate colloidal stability. Therefore, the *Archaea Halorubrum saccharovorum* can be considered as an alternative source of carotenoids and silver nanoparticles.

Keywords: *Archaea*. Carotenoids. Experimental design. Nanomaterials. Halophilic.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESTRUTURAS DOS CAROTENOS LICOPENO (a) E $\beta$ -CAROTENO (b) E DAS XANTOFILAS CANTAXANTINA (c) E VIOLAXANTINA (d)...	26
FIGURA 2 - BACTERIORRUBERINA E SEUS DERIVADOS: (a) <i>trans</i> -BACTERIORRUBERINA, (b) BISANIDROBACTERIORRUBERINA, (c) TRISANIDROBACTERIORRUBERINA, (d) 5- <i>cis</i> -BACTERIORRUBERINA, (e) 13- <i>cis</i> -BACTERIORRUBERINA, (f) 9- <i>cis</i> -BACTERIORRUBERINA.....	28
FIGURA 3 - BIOSÍNTESE DOS CAROTENOIDES NAS ARCHAEA HALOFÍLICAS A PARTIR DO PRECURSOR ACETIL-CoA.....	29
FIGURA 4 - BIOSÍNTESE DOS CAROTENOIDES NAS ARCHAEA HALOFÍLICAS A PARTIR DO PRECURSOR GERANILGERANIL DIFOSFATO].....	30
FIGURA 5 - ESPAÇO EXPERIMENTAL E QUANTIDADE DE ENSAIOS, REPRESENTADA POR PONTOS, PARA A OTIMIZAÇÃO DE UM PROCESSO COM 3 VARIÁVEIS (pH, TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO) UTILIZANDO TRÊS ESTRATÉGIAS DIFERENTES.....	39
FIGURA 6 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA TRIDIMENSIONAL E GRÁFICO DE CONTORNO EM DUAS DIMENSÕES MOSTRANDO O RENDIMENTO ESPERADO DE UM PROCESSO (y) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ( $x_1$ ) E DA TEMPERATURA ( $x_2$ ).....	45
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL 2 <sup>3</sup> .....	46
FIGURA 8 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA FORMAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR SÍNTESE VERDE EMPREGANDO EXTRATO DE PLANTA.....	49
FIGURA 9 - CULTIVOS DA ARCHAEA <i>Halorubrum saccharovorum</i> (ATCC <sup>®</sup> 29252 <sup>™</sup> ) NAS CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO DE 5%, 10%, 15%, 20% E 25% (p/v) .....	64
FIGURA 10 - CONCENTRAÇÕES DE CÉLULAS E DE CAROTENOIDES OBTIDAS DOS CULTIVOS DA ARCHAEA <i>Halorubrum saccharovorum</i> (ATCC <sup>®</sup> 29252 <sup>™</sup> ) ENTRE 10% E 25% DE	

CLORETO DE SÓDIO, VALORES DE PH INICIAL ENTRE 5 E 9 E TEMPERATURAS ENTRE 25 °C E 55 °C .....	65
FIGURA 11 - CURVAS DE CONTORNO PARA A CONCENTRAÇÃO CELULAR EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO E DO VALOR DE pH INICIAL (a), DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO E DA TEMPERATURA (b) E DO VALOR DE pH INICIAL E DA TEMPERATURA (c) .....	73
FIGURA 12 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA PARA A CONCENTRAÇÃO CELULAR EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO E DO VALOR DE pH INICIAL (a), DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO E DA TEMPERATURA (b) E DO VALOR DE pH INICIAL E DA TEMPERATURA (c) .....	74
FIGURA 13 - CURVA DE CONTORNO (a) E SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (b) PARA A CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO E DO VALOR DE pH INICIAL DO CULTIVO .....	75
FIGURA 14 - CINÉTICA DE FORMAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS NA TEMPERATURA DE 75 °C EMPREGANDO AS CÉLULAS FRESCAS (a) E SECAS (b) DA ARCHAEA <i>Halorubrum</i> <i>saccharovorum</i> (ATCC® 29252™) .....	79
FIGURA 15 - MISTURAS REACIONAIS CONTENDO AS NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS NA TEMPERATURA DE 75 °C A PARTIR DO EXTRATO DE CÉLULAS FRESCAS DA ARCHAEA <i>Halorubrum saccharovorum</i> (ATCC® 29252™) E SEUS CONTROLES NEGATIVOS.....	80
FIGURA 16 - DISTRIBUIÇÃO DOS DIÂMETROS HIDRODINÂMICOS EM NÚMERO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS A PARTIR DOS EXTRATOS DE CÉLULAS FRESCAS DA ARCHAEA <i>Halorubrum saccharovorum</i> (ATCC® 29252™) NA TEMPERATURA DE 75 °C.....	81
FIGURA 17 - CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS NA TEMPERATURA DE 75 °C A PARTIR DOS EXTRATOS DE CÉLULAS FRESCAS E SECAS DA ARCHAEA <i>Halorubrum saccharovorum</i> (ATCC® 29252™) .....	82

FIGURA 18 - IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS NA TEMPERATURA DE 75 °C A PARTIR DOS EXTRATOS DE CÉLULAS FRESCAS (a) E SECAS (b) DA ARCHAEA <i>Halorubrum</i> <i>saccharovorum</i> (ATCC® 29252™) .....	83
FIGURA 19 - DISTRIBUIÇÃO DO DIÂMETRO SECO (ALTURA), OBTIDO POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA, DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS COM OS EXTRATOS DE CÉLULAS FRESCAS (a) E SECAS (b) DA ARCHAEA <i>Halorubrum</i> <i>saccharovorum</i> (ATCC® 29252™) NA TEMPERATURA DE 75 °C .....	84
FIGURA 20 - ESPECTROS DE MASSA MALDI-TOF OBTIDOS DOS EXTRATOS DE CÉLULAS FRESCAS (a) E SECAS (b) DA ARCHAEA <i>Halorubrum saccharovorum</i> .....	85

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 - CONDIÇÕES NUTRICIONAIS E OPERACIONAIS DE CULTIVO DAS ARCHAEA HALOFÍLICAS PARA A PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES .....	32
QUADRO 2 - MATRIZ DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL 2 <sup>3</sup> .....	46
TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS HALOFÍLICOS DE ACORDO COM AS CONCENTRAÇÕES DE SAL REQUERIDAS PARA O CRESCIMENTO .....	22
TABELA 2 - CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE CLORETO DE SÓDIO, VALORES DE pH INICIAL E TEMPERATURAS EMPREGADOS NOS CULTIVOS UTILIZADOS PARA VERIFICAR O CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES PELA ARCHAEA <i>Halorubrum</i> <i>saccharovorum</i> ATCC® 29252™ .....	54
TABELA 3 - FATORES CONTROLÁVEIS E SEUS NÍVEIS CODIFICADOS E REAIS NO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL.....	58
TABELA 4 - COMBINAÇÕES DOS NÍVEIS DOS FATORES CONTROLÁVEIS CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO, VAOR DE pH INICIAL E TEMPERATURA NOS 19 ENSAIOS DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL .....	59
TABELA 5 - NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS DOS FATORES CONTROLÁVEIS TESTADOS E CONCENTRAÇÕES DE CÉLULAS E DE CAROTENOIDES OBTIDAS EM CADA ENSAIO .....	68
TABELA 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A RESPOSTA CONCENTRAÇÃO CELULAR.....	69
TABELA 7 - ESTIMATIVA DOS COEFICIENTES DO MODELO POR ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A RESPOSTA CONCENTRAÇÃO CELULAR .....	70
TABELA 8 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A RESPOSTA CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES .....	70

TABELA 9 - ESTIMATIVA DOS COEFICIENTES DO MODELO POR ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A RESPOSTA CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES.....	71
---	----

## LISTA DE SIGLAS

AgNP – Nanopartículas de prata

ANOVA – Análise de Variância

ATCC – *American Type Culture Collection*

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

MALDI-TOF – ionização/dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo de voo (do inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization time off light*)

PdI - Índice de polidispersividade

UV-Vis – Ultravioleta-Visível



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
3.1 DOMÍNIO <i>ARCHAEA</i> .....	21
3.2 <i>ARCHAEA</i> HALOFÍLICAS.....	21
3.3 PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR <i>ARCHAEA</i> HALOFÍLICAS .....	25
3.3.1 Efeito de sais na produção de carotenoides.....	34
3.3.2 Efeito de fontes de carbono na produção de carotenoides .....	36
3.3.3 Efeito da luz e do oxigênio na produção de carotenoides .....	37
3.3.4 Otimização das condições de cultivo .....	38
3.3.5 Produção de carotenoides em cultivos em dois estágios .....	42
3.4 <i>ARCHAEA</i> HALOFÍLICA <i>Halorubrum saccharovorum</i> (ATCC® 29252™) .....	43
3.5 OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS EMPREGANDO PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS FATORIAIS .....	44
3.6 NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) .....	47
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
4.1 MICRO-ORGANISMO .....	51
4.2 MEIOS DE CULTURA.....	51
4.3 CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DO MICRO-ORGANISMO .....	51
4.4. DESENVOLVIMENTO DO INÓCULO.....	52
4.5 QUANTIFICAÇÃO DA MASSA MICROBIANA NA SUSPENSÃO DE CÉLULAS.....	53
4.6 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS PARA O CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES PELA <i>ARCHAEA Halorubrum saccharovorum</i> .....	53
4.7 VERIFICAÇÃO DO EFEITO DA LUZ NO CRESCIMENTO E NA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES PELA <i>ARCHAEA Halorubrum saccharovorum</i> .....	55
4.8 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS SECAS .....	55
4.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR.....	55
4.10 EXTRAÇÃO DOS CAROTENOIDES .....	56
4.11 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS.....	56

4.12 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CÉLULAS E DE CAROTENOIDES PELA <i>ARCHAEA Halorubrum saccharovorum</i> .....	57
4.13 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) .....	60
4.14 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) .....	61
4.15 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	62
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
5.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS NO CRESCIMENTO E NA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES PELA <i>ARCHAEA Halorubrum saccharovorum</i> .....	63
5.2 EFEITO DA PRESENÇA DE LUZ NO CRESCIMENTO E NA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES PELA <i>ARCHAEA Halorubrum saccharovorum</i> .....	67
5.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO CELULAR E DE CAROTENOIDES PELA <i>ARCHAEA Halorubrum saccharovorum</i> .....	67
5.4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs) .....	78
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As *Archaea* halofílicas podem ser utilizadas no preparo de alimentos fermentados, no tratamento de resíduos e em diversos processos industriais para a obtenção de proteínas (incluindo enzimas), polissacarídeos, poliésteres e lipídios, como os pigmentos carotenoides. (COWAN, 1992; OREN, 2002a; SCHIRALDI, GIULIANO e DE ROSA, 2002). Os carotenoides apresentam várias funções na saúde humana e potencial aplicação nas indústrias farmacêutica e alimentícia, como corantes e antioxidantes. (CHAPMAN, 2012; NISHINO et al., 2009; VACHALI, BHOSALE e BERNSTEIN, 2012; VÍLCHEZ et al., 2011). Poucos carotenoides, como o  $\beta$ -caroteno e a astaxantina, são produzidos industrialmente por cultivo microbiano (PAPAIOANNOU e LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2010).

Os principais carotenoides produzidos pelas *Archaea* halofílicas são a bacteriorrubrina e seus derivados, a monoanidrobacteriorrubrina, a bisanidrobacteriorrubrina e a trisanidrobacteriorrubrina. Porém, outros carotenoides também são encontrados nessas *Archaea*, como a cantaxantina, o licopeno e o  $\beta$ -caroteno. (ASKER e OHTA, 1999; KUSHWAHA, KRAMER e KATES, 1975; KUSHWAHA et al., 1972; MANDELLI et al., 2012; SUI, LIU e DENG, 2014). Para que os carotenoides de *Archaea* halofílicas possam apresentar potencial biotecnológico, é necessário que o processo de produção apresente custo baixo. Uma das alternativas para diminuir o custo de produção é aumentar o rendimento da produção dos carotenoides por meio da otimização das condições de cultivo. Fatores nutricionais e físicos durante o cultivo, como a composição do meio, o pH, a temperatura, a incidência de luz e a tensão de oxigênio podem influenciar na produção de carotenoides. (CALEGARI-SANTOS et al., 2016). Diferentes estratégias podem ser utilizadas para a otimização de processos; dentre elas está a metodologia de superfície de resposta, na qual a condição ótima pode ser identificada explorando todo o espaço experimental com um número reduzido de experimentos.

Assim como os carotenoides, as nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido alvo de várias pesquisas devido à sua ampla gama de propriedades. Podem ser empregadas como agentes terapêuticos, destacando-se seus efeitos antibacterianos, antifúngicos, antivirais, anti-inflamatórios e anticâncer. Devido ao seu amplo espectro de atuação como antimicrobiano, as AgNPs apresentam aplicações biomédicas e ambientais bem como em cosméticos, vestuário e produtos de consumo. (OTARI et

al., 2012, 2014; TALEKAR et al., 2016). As AgNPs podem ser sintetizadas por diferentes métodos físicos e químicos. Porém, estes métodos apresentam desvantagens como a utilização de solventes orgânicos e procedimentos de purificação difíceis e laboriosos. (NARAYANAN e SAKTHIVEL, 2010; SUNKAR e NACHIYAR, 2011). Por isso, mundialmente, há um crescente aumento na busca de sistemas biológicos provenientes de extratos de plantas, leveduras, fungos e bactérias para atuarem como agentes redutores e estabilizantes para a obtenção de AgNPs, caracterizando as rotas de síntese verde ou síntese biológica. As rotas microbianas são promissoras pois o uso e formação de subprodutos tóxicos podem ser minimizados e/ou eliminados. Além disso, vários fatores, como métodos de cultivo microbiano e técnicas de extração, podem ser otimizados para a síntese rápida de nanopartículas. (OTARI et al., 2014).

Os carotenoides produzidos por *Archaea* halofílicas tem mostrado capacidade antioxidante, propriedade que pode contribuir com novas funções para produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos produzidos pela indústria. Além disso, a capacidade antioxidante e, conseqüentemente, redutora destes carotenoides pode ser promissora para a redução de íons prata e, portanto, formação das nanopartículas de prata. Com isso, a *Archaea* halofílica *Halorubrum saccharovororum* (ATCC® 29252™), pertencente à família *Halobacteriaceae* (CATALOGUE OF LIFE, 2012; TOMLINSON e HOCHSTEIN, 1972), consiste em nova alternativa para a produção de carotenoides e síntese de nanopartículas de prata visto que não há relatos na literatura sobre o seu cultivo para estas finalidades.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Cultivar a *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) visando à otimização da produção de carotenoides e à síntese de nanopartículas de prata.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as variáveis que influenciam no crescimento e produção de carotenoides pela *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™).
- Desenvolver um planejamento experimental para avaliar o efeito do meio e das condições de cultivo no crescimento e na produção de carotenoides pela *Archaea Halorubrum saccharovorum*.
- Otimizar as condições de cultivo identificando as composições do meio e as condições ótimas para a produção de células e de carotenoides.
- Sintetizar AgNPs utilizando as células da *Archaea Halorubrum saccharovorum* cultivadas nas condições ótimas para a produção de carotenoides.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 DOMÍNIO *ARCHAEA*

Os organismos são classificados em três domínios - *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* - de acordo com seus tipos de células. Os três domínios diferem no RNA ribossômico, na estrutura lipídica da membrana, nas moléculas de RNA de transferência e na sensibilidade a antibióticos. O domínio *Eukarya* é constituído por animais, plantas, fungos e protistas. O domínio *Bacteria* inclui todos os procariotos patogênicos, assim como procariotos não patogênicos encontrados no solo e na água. (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012a). O domínio *Archaea* é composto por procariotos que não têm peptidoglicano nas suas paredes celulares e frequentemente habitam ambientes extremos como aqueles com alta temperatura, alta concentração de sais e extremos de pH. (MATSUMI et al., 2011; TORTORA, FUNKE e CASE, 2012a). Porém, sabe-se que micro-organismos deste domínio podem habitar também ambientes mais amenos, como a maioria dos oceanos, solos e até mesmo a flora intestinal. (CALO e EICHLER, 2011).

O domínio *Archaea* compreende micro-organismos procariotos diversos. A maioria apresenta morfologia convencional de bastonetes, cocos e espiralados, mas alguns apresentam morfologia incomum, como forma de disco com uma rede de túbulos ou forma quadrada. Alguns são gram-positivos, outros gram-negativos, alguns se dividem por fissão binária, outros por fragmentação ou brotamento, alguns não possuem parede celular. Há aqueles que habitam ambientes extremos e outros que produzem metano. (BOLHUIS, POELE e RODRIGUEZ-VALERA, 2004; TORTORA, FUNKE e CASE, 2012a).

#### 3.2 *ARCHAEA* HALOFÍLICAS

Os micro-organismos halofílicos necessitam de concentrações substanciais de sais, geralmente cloreto de sódio, para o seu crescimento e, de acordo com estas concentrações, podem ser classificados em diferentes categorias. Segundo a classificação bastante difundida proposta por Kushner, os micro-organismos halofílicos podem ser halofílicos extremos, halofílicos extremos limítrofes, moderadamente halofílicos e levemente halofílicos. As concentrações mínimas e

máximas bem como as concentrações ótimas de sais requeridas pelos micro-organismos pertencentes a estas diferentes categorias são mostradas na TABELA 1. Os micro-organismos podem ser ainda halotolerantes, quando não são halofílicos, mas podem tolerar altas concentrações de sais; ou halofílicos facultativos, quando requerem cerca de  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de cloreto de sódio somente em certas condições ambientais. (KUSHNER, 1992; OREN, 2008).

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS HALOFÍLICOS DE ACORDO COM AS CONCENTRAÇÕES DE SAL REQUERIDAS PARA O CRESCIMENTO

Categoria	Concentração de sal ( $\text{mol.L}^{-1}$ )		
	Mínima	Máxima	Ótima
Halofílicos extremos	2	5,2	3 - 4
Halofílicos extremos limítrofes	1	4	2 - 3
Moderadamente halofílicos	0,4	3 - 3,5	0,5 - 2
Levemente halofílicos	0,2	2	0,2 - 0,5

FONTE: OREN (2008).

As *Archaea* halofílicas são micro-organismos aeróbios heterotróficos. A maioria das espécies necessita de  $1,7 \text{ mol.L}^{-1}$  (9,9%, p/v) a  $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$  (14,6%, p/v) de cloreto de sódio para o crescimento e a manutenção da estabilidade estrutural. Entretanto, algumas espécies são capazes de tolerar altas concentrações de cloreto de sódio em seu habitat, como  $5,5 \text{ mol.L}^{-1}$  (32,1%, p/v). (MADIGAN et al., 2012a; OREN, 2008).

Os íons sódio presentes em alta concentração no ambiente ajudam a estabilizar a parede celular das *Archaea* halofílicas visto que estes íons se ligam aos grupos carregados negativamente da parede celular, como os grupos ácido carboxílico dos aminoácidos aspartato e glutamato das glicoproteínas e os grupos sulfato. Quando existe baixa concentração de íons sódio no habitat, as cargas negativas da superfície celular das *Archaea* halofílicas tendem a se repelir e causar a lise celular. (FENDRIHAN et al., 2006; MADIGAN et al., 2012a, 2012b).

Para a manutenção do equilíbrio aquoso positivo, as *Archaea* halofílicas acumulam em suas células cloreto de potássio em concentração equivalente à concentração extracelular de cloreto de sódio. (OREN, 2008; QUILLAGUAMÁN et al., 2010). Algumas *Archaea* haloalcalifílicas, que crescem em regiões com alta concentração de sal e pH alcalino, também podem acumular a sulfotrealose, um

dissacarídeo que atua como um soluto orgânico aumentando a pressão osmótica do micro-organismo em resposta a um acréscimo da pressão osmótica do ambiente. (DESMARAIS et al., 1997).

As *Archaea* halofílicas apresentam importante aplicação industrial já que tanto suas células quanto seus metabólitos podem ser empregados em diferentes processos.

As células de *Archaea* halofílicas são comumente encontradas em salinas e auxiliam na produção de sal. Estes organismos aumentam a temperatura do ambiente ao seu redor à medida que captam a luz solar e, com isso, elevam a taxa de evaporação de água nas salinas, contribuindo para o aumento da produção de sal. *Archaea* dos gêneros *Halobacterium* e *Halococcus* presentes em sais marinhos podem ser utilizadas no preparo de alimentos fermentados como o "nam pla", um molho de peixe produzido na Tailândia. Para isto, uma parte de sal marinho contendo *Archaea* é mantida em contato com duas partes de peixe por cerca de um ano. Neste período de fermentação, as proteases das *Archaea* geram produtos que contribuem com o aroma do molho. (OREN, 2002a).

Alguns organismos halofílicos pertencentes aos gêneros *Haloarcula*, *Halobacterium* e *Haloferax* podem degradar hidrocarbonetos halogenados e inseticidas. Desta forma, podem ser utilizados na biorremediação de ambientes com alta concentração de sais, realizando a degradação de poluentes orgânicos nestes ambientes. Por outro lado, *Archaea* halofílicas produtoras de metabólitos biosurfactantes podem acelerar a biorremediação de ambientes salinos poluídos com óleo, assim como outras podem ser utilizadas no tratamento de resíduos aquosos concentrados da indústria têxtil, particularmente o resíduo do primeiro banho de tingimento que contém grande quantidade de sal. (OREN, 2002a; SCHIRALDI, GIULIANO e DE ROSA, 2002).

Algumas *Archaea* halofílicas secretam enzimas como amilases, amiloglucosidades, protease e lipases que podem ser utilizadas em processos que requerem a degradação de macromoléculas em altas concentrações de sais. (OREN, 2002a). Outra enzima produzida por *Archaea* halofílicas é a DNA topoisomerase tipo II a qual é sensível a algumas drogas que apresentam atividade contra a mesma enzima de células eucarióticas. Desta forma, é possível utilizar a enzima halofílica na busca e avaliação de possíveis agentes citostáticos. (COWAN, 1992).



Espécies de *Archaea* halófilicas como *Halobacterium halobium* e *Halobacterium salinarum* contém uma proteína integral de membrana denominada bacteriorodopsina que pode ser utilizada no processo de armazenamento de informação óptica, como a holografia, na produção de memórias de computador e na síntese células fotoelétricas ou voltaicas (membranas artificiais capazes de captar a luz solar e usá-la para a produção de eletricidade). Além disso, pode ser utilizada na síntese de grandes quantidades de ATP. (COWAN, 1992; OREN, 2002a).

Espécies de micro-organismos halófilicos, especialmente aquelas do gênero *Haloferax*, produzem grandes quantidades de biopolímeros extracelulares como polissacarídeos e poliésteres. Os polissacarídeos podem ser utilizados na modificação das propriedades reológicas de sistemas aquosos e na estabilização da viscosidade de soluções atuando como agentes espessantes, geleificantes e emulsificantes. O ácido poli- $\gamma$ -glutâmico, polímero produzido pela espécie *Natrialba aegyptiaca*, pode ser utilizado como espessante biodegradável, umectante ou carreador de drogas nas indústrias alimentícia e farmacêutica. (OREN, 2002a). Copolímeros de polihidroxibutirato (PHB) e polihidroxivalerato (PHV) são utilizados na produção de plásticos biodegradáveis e são uma alternativa aos termoplásticos derivados de óleos. (COWAN, 1992).

Os lipídios formados pelas *Archaea* halófilicas podem ser utilizados como aditivo alimentar, seja como emulsificante e/ou como lipídio de baixa caloria. (OREN, 2002a). Os lipídios também representam uma fonte excelente para a formação de lipossomas. Devido à sua estabilidade e aos perfis de distribuição nos tecidos, estes lipossomas podem ser utilizados em sistemas de liberação de drogas, genes ou agentes para visualização de cânceres. (SCHIRALDI, GIULIANO e DE ROSA, 2002).

As *Archaea* halófilicas ainda são capazes de produzir compostos isoprenoides como os pigmentos carotenoides bacteriorrubrina e seus derivados. (ASKER, AWAD e OHTA, 2002; FANG et al., 2010; KELLY e LIAAEN-JENSEN, 1967; KELLY, NORGÅRD e LIAAEN-JENSEN, 1970; KUSHWAHA et al., 1982; KUSHWAHA, KRAMER e KATES, 1975; LOBASSO et al., 2008; MANDELLI et al., 2012; RØNNEKLEIV e LIAAEN-JENSEN, 1992, 1995; TOMLINSON e HOCHSTEIN, 1976). Estes pigmentos podem ser utilizados como corante e antioxidante nas indústrias farmacêutica e alimentícia, assim como podem representar um uso potencial em humanos para reparar danos ao DNA causados pela radiação ionizante ou radiação ultravioleta e, portanto, prevenir contra o câncer de pele. (MANDELLI et al., 2012;

SINGH e GABANI, 2011). *Archaea* da espécie *Haloferax alexandrinus* pode produzir ainda outros carotenoides, como a cantaxantina, a qual pode ser empregada como corante em alimentos ou como agentes para pigmentação de cultivos de salmonídeos e crustáceos. (ASKER, AWAD e OHTA, 2002; ASKER e OHTA, 1999). Adicionalmente, a *Archaea* halofílica *Halobacterium salinarum* é capaz de formar o carotenoide *trans*-astaxantina, que é utilizado na alimentação de peixes como o salmão e a truta, auxiliando na pigmentação, crescimento e reprodução dos mesmos, assim como apresenta aplicação potencial nas indústrias nutracêutica e cosmética devido à sua atividade antioxidante. (CALO et al., 1995; SCHMIDT et al., 2011).

### 3.3 PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR ARCHAEA HALOFÍLICAS

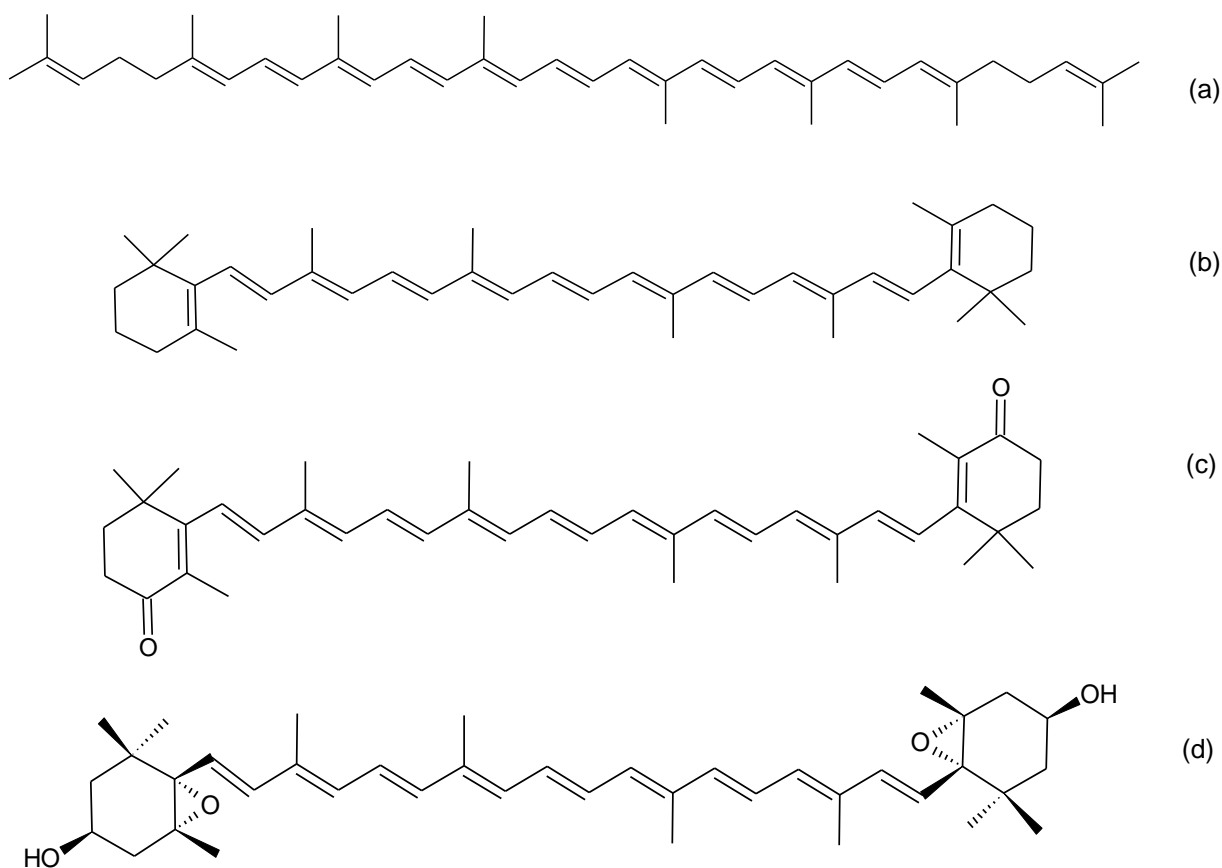
Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis sintetizados por plantas, algas e micro-organismos, conferindo-lhes coloração amarela, laranja ou vermelha. Os animais também podem apresentar coloração característica devido à obtenção e bioacumulação dos carotenoides na dieta, visto que não são capazes de sintetizá-los. (BRITTON, LIAAEN-JENSEN e PFANDER, 1995).

Comercialmente, os carotenoides são utilizados como suplementos nutricionais, corantes em alimentos e cosméticos e na ração animal. Em 2014, o valor de mercado mundial dos carotenoides foi de US\$ 1,5 bilhões e, em 2019, espera-se atingir o valor de mercado de US\$ 1,8 bilhões. (HERNÁNDEZ-ALMANZA et al., 2016; BCC RESEARCH, 2015). No Brasil, em 2014, 129.515 kg de carotenoides foram importados, totalizando gastos de US\$ 1.955.527, e somente 1.036 kg foram exportados, representando lucro de US\$ 83.965. Em 2015, a quantidade de carotenoides importados diminuiu para 85.848 kg, totalizando gastos semelhantes (US\$ 1.891.110) àqueles verificados em 2014, e a quantidade de carotenoides exportados aumentou para 3.502 kg, representando lucro de US\$ 245.502. (MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS, 2016). Este cenário evidencia o potencial de crescimento do mercado de carotenoides no Brasil visto que a demanda por estes pigmentos pelo mercado interno é maior que a capacidade produtiva do país.

Os pigmentos carotenoides são constituídos por oito unidades de isopreno contendo ligações duplas conjugadas. A estrutura básica acíclica contém 40 átomos de carbono (C<sub>40</sub>), podendo ser representada pelo licopeno (FIGURA 1). A modificação

desta estrutura por reações de hidrogenação, desidrogenação, ciclização, oxidação ou adição de mais unidades de isopreno origina diferentes carotenoides. (DAVIES, 1976). Os carotenos são carotenoides que apresentam somente átomos de carbono e hidrogênio em sua estrutura, como o licopeno e o  $\beta$ -caroteno, e as xantofilas são os derivados oxigenados dos carotenos, como a cantaxantina, a astaxantina e violaxantina (FIGURA 1). (RIVERA e CANELA-GARAYOA, 2012).

FIGURA 1 - ESTRUTURAS DOS CAROTENOS LICOPENO (a) E  $\beta$ -CAROTENO (b) E DAS XANTOFILAS CANTAXANTINA (c) E VIOLAXANTINA (d)



FONTE: O autor (2016).

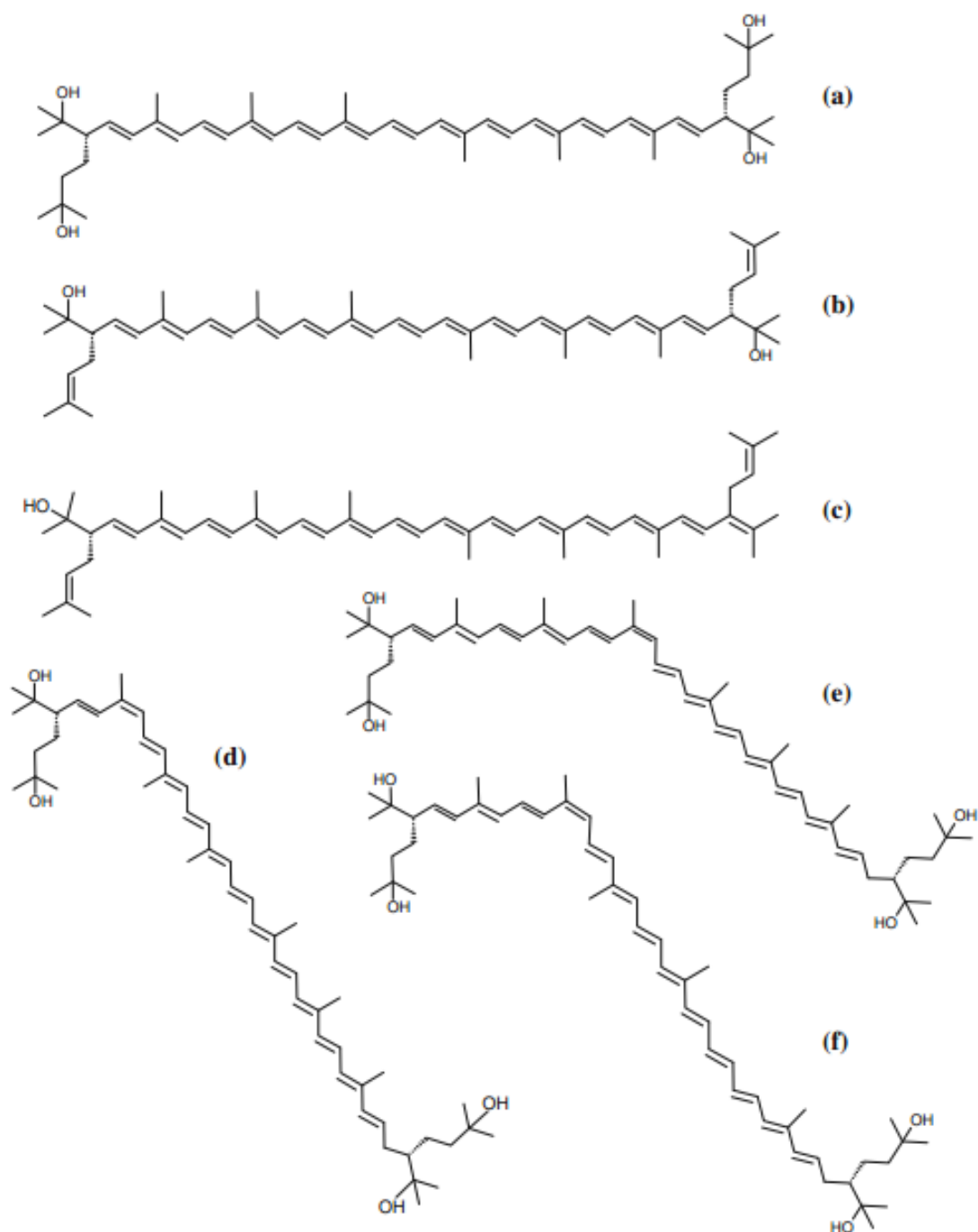
Nas *Archaea* halofílicas já foram identificados os carotenoides bacteriorrubrina, caroteno, licopeno, cantaxantina, 3-hidroxi-equinenona, licoperseno, fitoeno, fitoflueno e 2-isopentenil-3,4-dehidrorodopina. (ASKER, AWAD e OHTA, 2002; ASKER e OHTA, 1999; EVANS, KUSHWAHA e KATES, 1980; FANG et al., 2010; KELLY, NORGÅRD e LIAAEN-JENSEN, 1970; KUSHWAHA et al., 1974; KUSHWAHA et al., 1982; KUSHWAHA, KRAMER e KATES, 1975; KUSHWAHA et

al., 1972; LOBASSO et al., 2008; RØNNEKLEIV et al., 1995; RØNNEKLEIV e LIAAEN-JENSEN, 1995; STIEHL, RULLKÖTTER e NISSENBAUM, 2005; TORNABENE et al., 1969). Alguns destes carotenoides estão presentes em baixas concentrações, sugerindo que podem ser precursores de outros carotenoides. (OREN, 2002c).

Geralmente, a bacteriorruberina é o principal carotenoide nas *Archaea* halofílicas. (ASKER, AWAD e OHTA, 2002; FANG et al., 2010; KELLY e LIAAEN-JENSEN, 1967; KELLY, NORGÅRD e LIAAEN-JENSEN, 1970; KUSHWAHA, KRAMER e KATES, 1975; RØNNEKLEIV e LIAAEN-JENSEN, 1992). Este carotenoide e seus derivados (FIGURA 2), a monoanidrobacteriorruberina, a bisanidrobacteriorruberina e a trisanidrobacteriorruberina, possuem 50 átomos de carbono (C<sub>50</sub>) e podem estar na forma de isômeros geométricos *trans* e *cis* (5-*cis*-bacteriorruberina, 9-*cis*-bacteriorruberina, 13-*cis*-bacteriorruberina, 15-*cis*-bacteriorruberina e 5-*cis*,9'-*cis*-bacteriorruberina). (BRITTON, LIAAEN-JENSEN e PFANDER, 1995; MANDELLI et al., 2012; RØNNEKLEIV e LIAAEN-JENSEN, 1992).

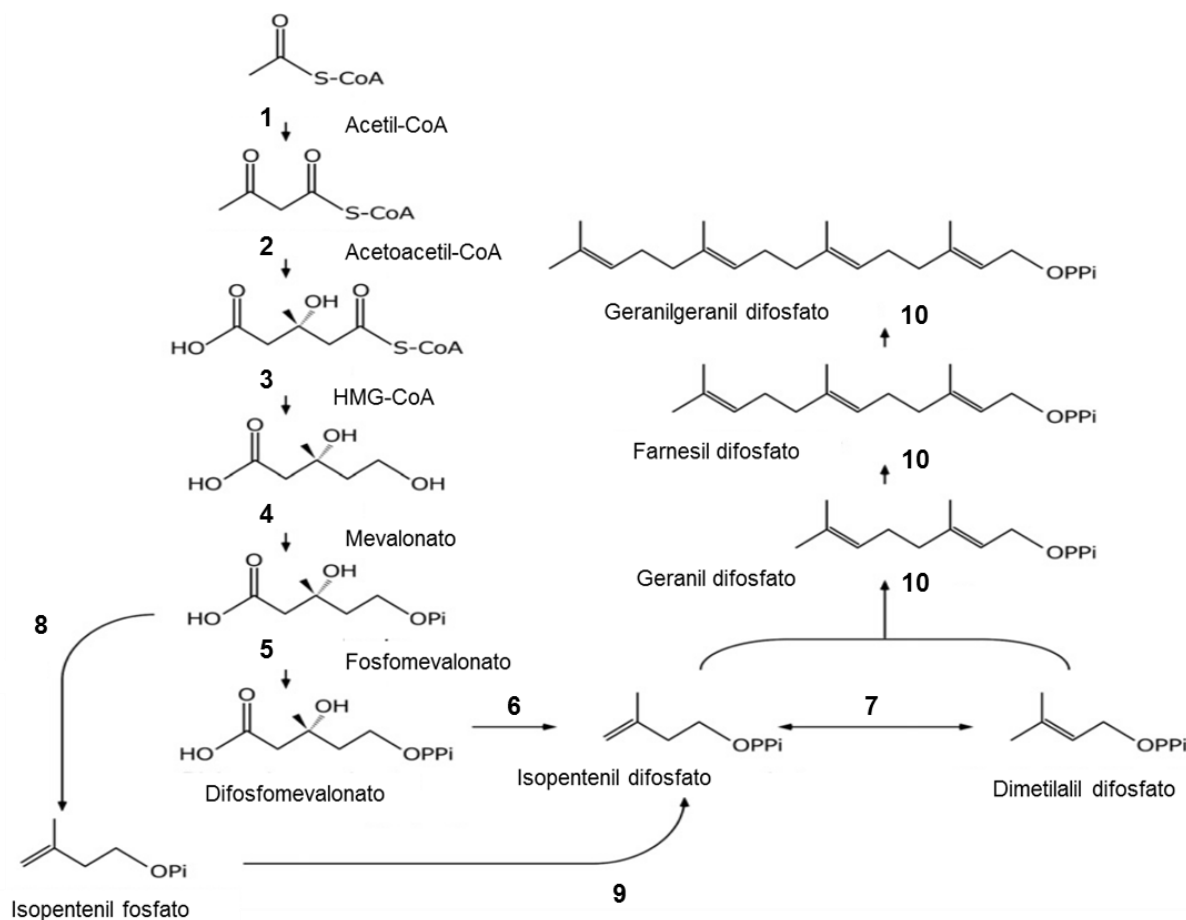
Nas *Archaea* halofílicas, os carotenoides são provavelmente biossintetizados pela via do mevalonato em duas fases. Na primeira fase, ocorre a síntese de dois precursores com cinco átomos de carbono, o isopentenil difosfato e seu isômero, o dimetilalil difosfato, ambos derivados do acetil-CoA (FIGURA 3). Na segunda fase, estes precursores sofrem policondensação, originando os carotenoides. As etapas desta via e as enzimas envolvidas não estão completamente estabelecidas (FIGURAS 3 E 4). (FALB et al., 2008; HEIDER et al., 2014; MATSUMI et al., 2011). Segundo Pfander (1994), a síntese da bacteriorruberina ocorre pela adição de grupos prenil, com 5 átomos de carbono, nas extremidades da molécula do licopeno com subsequente incorporação dos grupos hidroxila. Biossíntese semelhante da bacteriorruberina, a partir do licopeno, na *Archaea* halofílica *Halobacterium salinarum* foi proposta por Dummer et al. (2011). Entretanto, na *Archaea* halofílica *Haloarcula japonica* JCM 7785<sup>T</sup>, a adição do grupo prenil e de uma hidroxila na molécula do licopeno ocorre simultaneamente e é catalisada pela mesma enzima. Em seguida, esta enzima catalisa a adição do segundo grupo prenil e de outro grupo hidroxila. Os outros dois grupos hidroxila são adicionados somente após a finalização do alongamento da molécula de licopeno. (YANG et al., 2015). Portanto, a síntese da bacteriorruberina parece similar, mas com particularidades, nas diferentes espécies de *Archaea* halofílicas.

FIGURA 2 - BACTERIORRUBERINA E SEUS DERIVADOS: (a) *trans*-BACTERIORRUBERINA, (b) BISANIDROBACTERIORRUBERINA, (c) TRISANIDROBACTERIORRUBERINA, (d) 5-*cis*-BACTERIORRUBERINA, (e) 13-*cis*-BACTERIORRUBERINA, (f) 9-*cis*-BACTERIORRUBERINA



FONTE: MANDELLI et al. (2012).

FIGURA 3 - BIOSÍNTESE DOS CAROTENOIDES NAS ARCHAEA HALOFÍLICAS A PARTIR DO PRECURSOR ACETIL-CoA



FONTE: Adaptado de MATSUMI et al. (2011).

LEGENDA: Representação da via do mevalonato clássica, encontrada nas bactérias e nos eucariotos, e da via do mevalonato modificada, proposta para as *Archaea* (compreende a utilização do fosfomevalonato para a produção do isopentenil fosfato e, em seguida, do isopentenil difosfato). Os números indicados nas reações representam as enzimas possivelmente envolvidas na via do mevalonato nas *Archaea* (1: acetoacetyl-CoA tiolase; 2: HMG-CoA sintase; 3: HMG-CoA redutase; 4: mevalonato quinase; 5: fosfomevalonato quinase; 6: difosfomevalonato descarboxilase; 7: isopentenil difosfato isomerase; 8: fosfomevalonato quinase; 9: isopentenil fosfato quinase; 10: preniltransferase).



A bacteriorrubrina apresenta funções biológicas importantes nas *Archaea* halofílicas, atuando como reforço de membrana celular, visto que aumenta a rigidez da membrana e diminui a permeabilidade à água (FANG et al., 2010; LAZRAK et al., 1988); e protegendo o micro-organismo contra agentes que causam danos ao DNA como a radiação ionizante, a radiação ultravioleta e o peróxido de hidrogênio, provavelmente devido à sua capacidade antioxidante. (OREN, 2002c; SINGH e GABANI, 2011). Mandelli et al. (2012) demonstraram que extratos das células de *Halococcus morrhuaea* e *Halobacterium salinarum* contendo bacteriorrubrina e seus derivados possuem alta atividade antioxidante.

A capacidade antioxidante dos carotenoides está relacionada com a sua estrutura química, especialmente o tamanho da cadeia poliênica, ou seja, a quantidade de duplas ligações conjugadas, e a natureza dos grupos funcionais terminais. (BRITTON, 1995a). O maior comprimento e a máxima sobreposição dos orbitais moleculares das duplas ligações conjugadas dos carotenoides implica em maior atividade antioxidante. Isto explica a alta capacidade antioxidante da bacteriorrubrina, a qual apresenta 13 duplas ligações conjugadas. (MANDELLI et al., 2012).

Considerando que os carotenoides de *Archaea* halofílicas podem ser utilizados futuramente como uma fonte alternativa de carotenoides e que existem poucos estudos sobre os carotenoides produzidos por estas *Archaea*, é interessante estudar estes micro-organismos, seus carotenoides e as respectivas funções biológicas. Além disso, para que os carotenoides de *Archaea* halofílicas possam apresentar potencial biotecnológico, é necessário que o processo de produção apresente baixo custo. Uma das alternativas para diminuir o custo de produção é aumentar o rendimento do produto, neste caso, dos carotenoides. Fatores nutricionais e físicos influenciam na produção de carotenoides por *Archaea* halofílicas e, por isso, diferentes condições de cultivo podem ser utilizadas para proporcionar o aumento na concentração de carotenoides produzidos. O QUADRO 1 mostra as *Archaea* halofílicas que já foram cultivadas para a produção de carotenoides bem como os meios utilizados nestes cultivos. Diferentes condições de cultivo, como a concentração de sais e de fontes de carbono, a incidência de luz e a tensão de oxigênio, foram empregadas para a verificação dos seus efeitos na produção de carotenoides. Além disso, estratégias de otimização e de cultivos em dois estágios já foram utilizadas para aumentar o



rendimento de carotenoides por *Archaea* halofílicas. (CALEGARI-SANTOS et al., 2016).

QUADRO 1 – CONDIÇÕES NUTRICIONAIS E OPERACIONAIS DE CULTIVO DAS *ARCHAEA* HALOFÍLICAS PARA A PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES

(continua)

<i>Archaea</i> halofílica	Meios e condições de cultivo	Condições de cultivo testadas
R-4 ( <i>Haloferax mediterranei</i> ATCC® 33500™)	Composição de um meio com 20% de sais (% p/v): 15,6% NaCl, 1,3% MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O, 2% MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, 0,1% CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O, 0,4% KCl, 0,02% NaHCO <sub>3</sub> , 0,05% NaBr, 1% extrato de levedura; 100 mL de meio em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, 38 °C, agitação magnética (RODRIGUEZ-VALERA, RUIZ-BERRAQUERO e RAMOS-CORMENZANA, 1980)	15%, 20% e 25% de sais
R-4 ( <i>Haloferax mediterranei</i> ATCC® 33500™) <i>Halobacterium cutirubrum</i> ( <i>Halobacterium salinarum</i> ATCC® 33170™)	Meio composto (% p/v) de sais inorgânicos 19,4% NaCl, 1,6% MgCl <sub>2</sub> , 2,4% MgSO <sub>4</sub> , 0,1% CaCl <sub>2</sub> , 0,5% KCl, 0,02% NaHCO <sub>3</sub> , 0,05% NaBr e 0,5% extrato de levedura; pH 7,3, 38 °C, 4 dias (KUSHWAHA et al., 1982)	15%, 20%, 25% e 35% sais totais
<i>Haloferax mediterranei</i> ATCC® 33500™	Meio de sais sintéticos contendo 20% NaCl, 0,5% glicose e 0,05 mol.L <sup>-1</sup> Tris-HCl; pH 7,2, 72 h (D'SOUZA, ALTEKAR e D'SOUZA, 1997)	20%, 15%, 10 %, 5% e 0% NaCl
<i>Haloferax volcanii</i> WFD11 (DSM 5716)	Meio contendo (% p/v) 12,5% (2,1 mol.L <sup>-1</sup> ) ou 20,6% (3,5 mol.L <sup>-1</sup> ) NaCl, 4,5% MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O, 1% MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, 1% KCl, 0,134 mL 10% CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O, 0,3% extrato de levedura e 0,5% triptona; 42 °C, agitação vigorosa (BIDLE et al., 2007)	12,5% e 20,6% NaCl
<i>Halobacterium</i> SP-2 <i>Halorubrum</i> SP-4	Meio completo modificado (CM) contendo (% p/v) 1% extrato de levedura, 0,75% caseína hidrolisada ácida e água salgada (25% sais); pH 7,2; 100 mL de meio em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, 37 °C, 150 rpm, 11 dias (SUI, LIU e DENG, 2014)	15%, 20%, 25% e 30% sais pH 6, 7, 8 e 9
TM ( <i>Haloferax alexandrinus</i> JCM 10717)	Meio complexo contendo (% p/v) 1% extrato de levedura, 0,75% casaminoácidos, 25% NaCl, 4% MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, 0,2% KCl e 0,3% citrato trissódico; pH 7,2, 100 mL de meio em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, 37 °C, 240 rpm, 7 dias (ASKER e OHTA, 1999)	0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 35% NaCl 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% e 6% MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, MgCl <sub>2</sub> e Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5% e 1% KCl Ausência e presença de elementos-traço (0,23 mg FeCl <sub>2</sub> , 0,7 mg CaCl <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O, 0,03 mg MnSO <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O, 0,044 mg ZnSO <sub>4</sub> , 5 µg CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O em 100 mL) Tempo de cultivo (1 a 8 dias) Temperaturas de 15 °C a 55 °C (em incrementos de 5 °C) pH 4,5 a 9,0 Ausência e presença de agitação Volumes de meio (100 mL, 200 mL, 300 mL e 400 mL em frascos de Erlenmeyer de 500 mL) Iluminação

(conclusão)		
<i>Archaea</i> halofílica	Meios e condições de cultivo	Condições de cultivo testadas
<i>Haloferax alexandrinus</i> TM (JCM 10717)	Meio padrão para crescimento contendo (% p/v) 1% extrato de levedura, 0,75% casaminoácidos, 25% NaCl, 4% MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, 0,2% KCl, 0,3% citrato trissódico e 1 mL de uma solução de elementos-traço (2,3 mg FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O, 7 mg CaCl <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O, 0,3 mg MnSO <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O, 0,44 mg ZnSO <sub>4</sub> , 0,05 mg CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O em 100 mL); pH 7,2, 37 °C, cultivos de 6 L, 6 dias (ASKER, AWAD e OHTA, 2002)	10%, 15%, 20% e 25% NaCl
<i>Halobacterium cutirubrum</i> NRC 34001 ( <i>Halobacterium salinarum</i> ATCC® 33170™) <i>Halobacterium halobium</i> NRC 34020 ( <i>Halobacterium salinarum</i> ATCC® 43214™)	<u>Meio BSMK</u> contendo 15 aminoácidos, nucleotídeos, e os sais (% p/v) 25% NaCl, 0,2% KCl, 0,5% NH <sub>4</sub> Cl, 2% MgSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O, 0,01% KNO <sub>3</sub> , 0,005% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,005% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,05% citrato de sódio, 3x10 <sup>-5</sup> % MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, 7x10 <sup>-4</sup> % CaCl <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O, 4x10 <sup>-6</sup> % ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, 2.3x10 <sup>-4</sup> % FeCl <sub>2</sub> , 5x10 <sup>-6</sup> % CuSO <sub>4</sub> ; pH 6,5, geralmente 100 mL de meio em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, 37 °C, 7 dias, com agitação <u>Meio complexo</u> contendo casaminoácidos, extrato de levedura, os sais (% p/v) 25% NaCl, 0,2% KCl, 2% MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O e outros sais; geralmente 100 mL de meio em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, 37 °C, 7 dias, com agitação (GOCHNAUER et al., 1972)	0%, 0,1%, 0,5%, 1% e 2% glicerol 0%, 0,1%, 0,5%, 2% e 4% glicose Ausência e presença de luz (3 bulbos de luz incandescente, totalizando 65 W, ao redor de uma lâmpada fluorescente circular de 20 cm de diâmetro)  0,1% glicerol 2% glicose
<i>Halobacterium salinarum</i> JCM 10927	25% NaCl, 0,15% casaminoácidos, 0,03% citrato trissódico, 0,025% ácido glutâmico, 2% MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O e 0,2% KCl; pH 7,0, 250 mL de meio em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, 37 °C, agitação suave, até o início da fase estacionária (EL-SAYED et al., 2002)	Ausência e presença de luz (60 µmol fótons.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> de lâmpadas fluorescentes) Baixa (borbulhamento de N <sub>2</sub> ) e alta tensão de oxigênio
<i>Halorubrum</i> sp. TBZ126	Meio marinho contendo (% p/v) 0,59% MgCl <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O, 0,324% MgSO <sub>4</sub> , 0,18% CaCl <sub>2</sub> , 0,055% KCl, 0,016% NaHCO <sub>3</sub> , 0,008% KBr, 0,0034% SrCl <sub>2</sub> , 0,0022% H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 0,0004% Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Si, 0,00024% NaF, 0,00016% NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , 0,0008% Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5% peptona, 0,1% extrato de levedura e várias concentrações de NaCl; 90 mL de meio em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, 120 rpm, 9 dias (HAMIDI et al., 2014)	Temperaturas de 15 °C, 22 °C, 32,5 °C, 43 °C e 50 °C pH 4, 5,2, 7, 8,7 e 10 2,5%, 8,8%, 16,25%, 24% e 30% NaCl Escuro e sob constante luz fluorescente branca (lâmpada fluorescente de 36 Watt Dulux®)
<i>Haloferax mediterranei</i> ATCC® 33500™	<u>Primeiro estágio</u> : (% p/v) 1% glicose, 15,6% NaCl, 1,3% MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O, 2% MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, 0,1% CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O, 0,4% KCl, 0,02% NaHCO <sub>3</sub> , 0,05% NaBr e 0,5% extrato de levedura; pH 7; 15 L de meio em fermentador de 20 L, 37 °C, 150 rpm, aeração de 1 vvm <sup>a</sup> (15 nL/min) <u>Segundo estágio</u> : 20% NaCl (p/v), 0,1% glicose (p/v) e 50 mmol.L <sup>-1</sup> Tris-HCl; pH 7,2, frascos Hinton de 500 mL, 37 °C, 120 rpm por diferentes tempos (FANG et al., 2010)	<u>1° estágio</u> : tempos de crescimento de 48 horas, 60 horas e 80 horas <u>2° estágio</u> : 5%, 10% e 20% NaCl 0%, 2%, 8%, 10%, 12%, 16% e 20% MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,1%, 0,5%, 1% e 2% glicose e CH <sub>3</sub> COONa Tempos de cultivo (24 horas, 36 horas e 48 horas)

FONTE: O autor (2016).

### 3.3.1 Efeito de sais na produção de carotenoides

A *Archaea* halofílica inicialmente denominada R-4 e posteriormente identificada como *Haloferax mediterranei* ATCC® 33500™ foi cultivada em meio líquido contendo as concentrações de sal total de 15%, 20% e 25% (p/v) (QUADRO 1). Em meio com 15% (p/v) de sal, a *Archaea* produziu cerca de vinte vezes mais carotenoides quando comparado ao cultivo em meio contendo 25% (p/v) de sal, baseando-se na mesma quantidade de proteína celular. (RODRIGUEZ-VALERA, RUIZ-BERRAQUERO e RAMOS-CORMENZANA, 1980)

A produção de carotenoides pela *Archaea* R-4 (*Haloferax mediterranei* ATCC® 33500™) em meios constituídos por 15%, 20%, 25% e 35% (p/v) de sais totais também foi avaliada por Kushwaha et al. (1982). A maior produção de carotenoides de 420 µg de bacteriorruberinas g<sup>-1</sup> de proteína celular também ocorreu no meio com 15% (p/v) de sais totais. Nos meios com 20%, 25% e 35% (p/v) de sais totais, a *Archaea* produziu apenas 80, 22 e 30 µg de bacteriorruberinas g<sup>-1</sup> de proteína celular, respectivamente. Os carotenoides monoanidrobacteriorruberina, bisanidrobacteriorruberina e β-caroteno também foram produzidos em maior quantidade no meio com 15% (p/v) de sais totais, porém, suas concentrações não ultrapassaram 65 µg g<sup>-1</sup> de proteína celular. Resultado oposto foi verificado quando os mesmos autores cultivaram a *Archaea Halobacterium cutirubrum*, atualmente chamada de *Halobacterium salinarum* ATCC® 33170™ nas mesmas condições. No meio contendo 15% (p/v) de sais totais, a *Archaea* não produziu nenhum carotenoide com quarenta ou cinquenta átomos de carbono, entretanto, nos meios com 20%, 25% e 35% (p/v) de sais totais, produziu mais de 1400 µg g<sup>-1</sup> de proteína celular.

A *Archaea Haloferax mediterranei* ATCC® 33500™ foi cultivada ainda por D'Souza, Altekar e D'Souza (1997) em meios com concentrações de cloreto de sódio de 20%, 15%, 10%, 5% e 0% (p/v) (QUADRO 1). A proporção do pigmento bacteriorruberina formado nas células do micro-organismo foi de 1:5:9 nas concentrações de cloreto de sódio de 20%, 10% e 5% (p/v), respectivamente. Portanto, com a diminuição da concentração de cloreto de sódio ocorreu o aumento da produção de carotenoide. Os autores sugeriram que o micro-organismo produziu mais bacteriorruberina em uma tentativa de estabilizar a membrana celular e reduzir a ruptura das células na condição de estresse desencadeada pela baixa concentração de sal no meio de cultivo.

O cultivo de *Haloferax volvanii* WFD11 (DSM 5716) em meios contendo 12,5% e 20,6% (p/v) de cloreto de sódio (QUADRO 1) evidenciaram que o micro-organismo produziu 1,6 a 1,7 vezes mais carotenoides, por célula, no meio contendo menor concentração de cloreto de sódio. (BIDLE et al., 2007). As *Archaea Halobacterium* SP-2 e *Halorubrum* SP-4, quando cultivadas em meios com 15%, 20%, 25% e 30% de sais (QUADRO 1), apresentaram aumento na produção de carotenoides à medida que ocorria a diminuição da concentração de sais. A maior concentração de carotenoides foi verificada na concentração de sal de 15% e foi atribuída à bacteriorruberina, identificada como componente majoritário. (SUI, LIU e DENG, 2014).

A *Archaea Haloferax alexandrinus* TM<sup>T</sup> (JCM 10717<sup>T</sup>) foi cultivada em meios contendo 0% a 35% (p/v) de cloreto de sódio, em intervalos de 5% (p/v), (QUADRO 1) e mostrou maior produção de carotenoides na concentração de cloreto de sódio de 25% (p/v). Nas concentrações de cloreto de sódio menores de 10% não houve crescimento nem produção de carotenoides. (ASKER e OHTA, 1999). Este micro-organismo também foi cultivado por Asker, Awad e Ohta (2002) utilizando o mesmo meio de cultivo acrescido de elementos-traço e nas concentrações de cloreto de sódio de 10%, 15%, 20% e 25% (p/v). No meio contendo 15% (p/v) de cloreto de sódio, da concentração total de carotenoides produzidos, 60,28% foi atribuído à bacteriorruberina, 3,55% aos isômeros da bacteriorruberina, 4,37% à monoanidrobacteriorruberina e 3,83% à trisanidrobacteriorruberina, tornando o cultivo de coloração vermelha intensa. Nas concentrações de cloreto de sódio de 20% e 25% (p/v), a produtividade de bacteriorruberinas diminuiu 8%. Em contrapartida, em 20% (p/v) de cloreto de sódio, a concentração de  $\beta$ -caroteno aumentou para 10% da quantidade total de carotenoides e, em 25% (p/v) de cloreto de sódio, a produtividade de cantaxantina aumentou entre 30% e 40% do total de carotenoides. Asker, Awad e Ohta (2002) corroboraram a hipótese de D'Souza, Altekhar e D'Souza (1997) de que a *Archaea* halofílica, com o objetivo de prevenir a lise celular, tende a acumular mais bacteriorruberinas quando se encontra em uma baixa concentração de cloreto de sódio.

As *Archaea Haloferax mediterranei* ATCC<sup>®</sup> 33500<sup>™</sup> e *Halobacterium salinarum* ATCC<sup>®</sup> 33170<sup>™</sup>, estudadas por Kushwaha et al. (1982) e cultivadas nos mesmos meios e condições, evidenciaram maiores produções de carotenoides em diferentes concentrações de cloreto de sódio de 15% e 25% (p/v), respectivamente. Com isso, pode-se inferir que os tipos de carotenoides produzidos por *Archaea* halofílicas bem

como suas concentrações devem estar relacionadas com os requerimentos de cloreto de sódio do micro-organismo.

Os tipos de nutrientes disponíveis também podem influenciar na concentração de carotenoides produzida por *Archaea* halofílicas visto que *Halobacterium salinarum* ATCC® 33170™ e *Haloferax alexandrinus* TM<sup>T</sup> (JCM 10717<sup>T</sup>) produziram maior concentração de carotenoides em meio contendo a mesma concentração de cloreto de sódio de 25% (p/v), porém com diferente composição em nutrientes.

### 3.3.2 Efeito de fontes de carbono na produção de carotenoides

A influência da glicose e do glicerol na produção de carotenoides por *Halobacterium cutirubrum* NCR 34001 e *Halobacterium halobium* NRC 34020, atualmente denominadas *Halobacterium salinarum* ATCC® 33170™ e *Halobacterium salinarum* ATCC® 43214™, respectivamente, foi avaliada por Gochbauer et al. (1972). De todas as concentrações testadas de glicose (0%, 0,1%, 0,5%, 2% e 4%, p/v), as maiores concentrações de bacteriorrubrina e  $\beta$ -caroteno ocorreram no meio quimicamente definido, BSMK, (QUADRO 1) contendo 0,5% (p/v) glicose. A produção de carotenoides foi inibida no meio contendo 4% (p/v) de glicose. Em relação ao glicerol, nas concentrações utilizadas de 0,1%, 0,5%, 1% e 2% (p/v), a produção de carotenoides C<sub>50</sub> diminuíram e de carotenos C<sub>40</sub> pareceram aumentar. Quando foi testado o meio complexo (QUADRO 1), a adição de 2% (p/v) de glicose aumentou a pigmentação e a adição de 0,1% (p/v) de glicerol não teve nenhum efeito na pigmentação. Os autores sugeriram que a glicose deve estimular a conversão de mevalonato em carotenos C<sub>40</sub> e bacteriorrubrina, enquanto o glicerol deve inibir a conversão de carotenos C<sub>40</sub> em bacteriorrubrinas C<sub>50</sub>. Kushwaha e Kates (1979) também investigaram, em detalhes, o efeito do glicerol na produção de carotenoides por *Halobacterium salinarum* ATCC® 33170™ e concluíram que o glicerol é um inibidor da produção de carotenoides neste micro-organismo. Portanto, somente a glicose poderia ser uma alternativa para aumentar a produção de carotenoides por *Archaea* halofílicas.

### 3.3.3 Efeito da luz e do oxigênio na produção de carotenoides

A luz pode regular a produção de carotenoides em uma variedade de micro-organismos. Nas *Archaea Halobacterium salinarum* ATCC® 33170™, *Halobacterium salinarum* ATCC® 43214™ e *Haloferax alexandrinus* TM (JCM 10717<sup>T</sup>) não houve diferença de pigmentação durante o cultivo (QUADRO 1) na ausência ou na presença de luz. (ASKER e OHTA, 1999; GOCHNAUER et al., 1972). O contrário ocorreu com a *Archaea Halobacterium salinarum* JCM 10927 cultivada na ausência de luz e sob incidência de luz de 60  $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (QUADRO 1). Quando cultivada no escuro, a *Archaea* produziu bacteriorrubrina e  $\beta$ -caroteno nas concentrações de  $4 \pm 0,4 \text{ nmol por } 10^{10} \text{ células}$  e  $2,7 \pm 0,4 \text{ nmol por } 10^{10} \text{ células}$ , respectivamente. Na presença de luz, a concentração de bacteriorrubrina aumentou para  $10 \pm 0,2 \text{ nmol por } 10^{10} \text{ células}$  e de  $\beta$ -caroteno diminuiu para  $0,7 \pm 0,0 \text{ nmol por } 10^{10} \text{ células}$ . A menor concentração de  $\beta$ -caroteno determinada pode ser explicada pela clivagem da molécula no seu centro para produzir duas moléculas de retinal. (EL-SAYED et al., 2002).

Os mesmos autores testaram simultaneamente a influência da luz e da tensão de oxigênio (QUADRO 1) na produção de carotenoides pela *Archaea Halobacterium salinarum* JCM 10927. Quando cultivado sob a incidência de luz e em baixa tensão de oxigênio, atingida com o borbulhamento de gás nitrogênio, o micro-organismo produziu a concentração de bacteriorrubrina de  $3,9 \pm 0,4 \text{ nmol por } 10^{10} \text{ células}$ . Esta diminuição da concentração de bacteriorrubrina já era esperada visto que a biossíntese da bacteriorrubrina a partir do licopeno envolve reações de hidroxilação que dependem da presença de oxigênio. No cultivo realizado no escuro, o conteúdo total de carotenóide não mostrou mudanças significativas com a baixa tensão de oxigênio. Considerando a via do mevalonato para a produção de carotenoides, os autores concluíram que a síntese destes pigmentos até o licopeno não sofre influência da diminuição da tensão de oxigênio no escuro. Efeito contrário ocorre com a bacteriorrubrina, cuja síntese é suprimida em baixa tensão de oxigênio, favorecendo o aumento da concentração  $\beta$ -caroteno e/ou retinal. A maior concentração de carotenoides totais de  $15,2 \text{ nmol por } 10^{10} \text{ células}$  foi atribuída à bacteriorrubrina e obtida na presença de luz e em alta tensão de oxigênio. Estes resultados corroboram a hipótese de que a bacteriorrubrina desempenha a função de fotoproteção. (EL-SAYED et al., 2002).

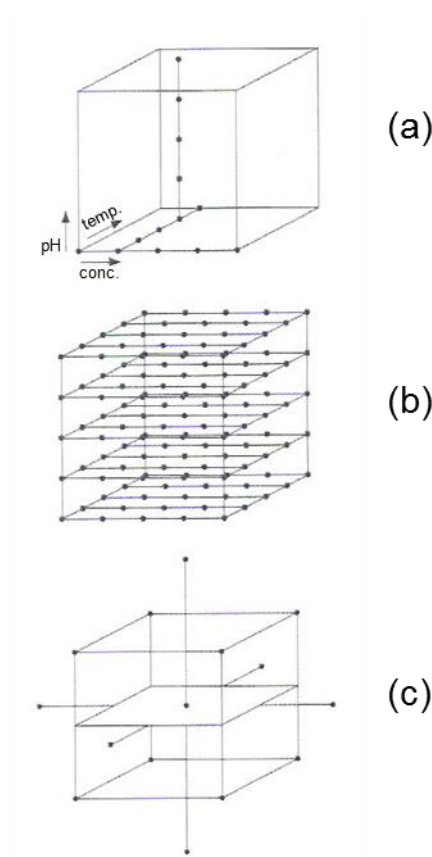
### 3.3.4 Otimização das condições de cultivo

Três estratégias diferentes podem ser utilizadas para o desenvolvimento de estudos de otimização de processos biotecnológicos. A primeira estratégia emprega o “estudo de uma variável por vez”, ou seja, uma das variáveis do processo é alterada enquanto todas as outras variáveis são mantidas fixas. O valor ótimo encontrado é então fixado e as outras variáveis são alteradas, uma de cada vez, até que todas tenham sido otimizadas. Nesta estratégia, considerada ineficiente, a melhor solução para o processo pode não ser encontrada visto que não é explorado todo o espaço experimental e possíveis interações entre as variáveis não são detectadas. A segunda estratégia envolve a realização de todas as combinações possíveis dos valores das variáveis até a obtenção da condição otimizada. Apesar de explorar todo o espaço experimental, esta estratégia apresenta a desvantagem de requerer um grande número de experimentos. Finalmente, a terceira estratégia se caracteriza pela realização de um planejamento experimental fatorial, empregando, por exemplo, a metodologia de superfície de resposta. Nesta estratégia, a condição ótima é encontrada explorando todo o espaço experimental com um número reduzido de experimentos. A FIGURA 5 mostra o espaço experimental e a necessidade da realização de 13, 125 e 17 ensaios para a otimização de um processo com três variáveis (pH, temperatura e concentração) utilizando uma variável por vez, todas as combinações possíveis das variáveis e um planejamento estatístico, respectivamente. (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

A *Archaea Haloferax alexandrinus* TM (JCM 10717<sup>T</sup>) foi cultivada em várias condições por meio da estratégia de otimização “uma variável por vez”. Após a determinação da concentração ótima de cloreto de sódio de 25% (p/v), *Haloferax alexandrinus* foi cultivada em meios (QUADRO 1) contendo os sais sulfato de magnésio heptaidratado (0% a 6%, p/v, em intervalos de 1%, p/v), cloreto de magnésio ou sulfato de sódio com o objetivo de determinar se o micro-organismo necessitava do ânion sulfato ou do cátion magnésio para o crescimento e a produção de carotenoides. Em meios com menos de 1% (p/v) de sulfato de magnésio não houve crescimento nem produção de carotenoides pela *Archaea*. Já em meios com mais de 4% (p/v) de sulfato de magnésio, tanto o crescimento quanto a produção de carotenoides foram baixas. Em meios com até 3% (p/v) de cloreto de magnésio, a *Archaea* cresceu lentamente e produziu pequena concentração de carotenoides.

Adicionalmente, o crescimento da *Archaea* não ocorreu em nenhum dos meios contendo sulfato de sódio. Com isso, os autores concluíram que *Haloferax alexandrinus* necessitava de magnésio e sulfato para o crescimento e produção de carotenoides. Possivelmente o micro-organismo necessita de magnésio para a divisão celular e sulfato para a composição da sua parede celular. (ASKER e OHTA, 1999).

FIGURA 5 - ESPAÇO EXPERIMENTAL E QUANTIDADE DE ENSAIOS, REPRESENTADA POR PONTOS, PARA A OTIMIZAÇÃO DE UM PROCESSO COM 3 VARIÁVEIS (pH, TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO) UTILIZANDO TRÊS ESTRATÉGIAS DIFERENTES



FONTE: Modificado de RODRIGUES e IEMMA (2005).

NOTA: As estratégias representadas são a análise de uma variável por vez (a), a análise de todas as combinações possíveis das variáveis (b) e o planejamento experimental fatorial (delineamento composto central rotacional) (c).

A avaliação da influência do sal cloreto de potássio, nas concentrações de 0%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5% e 1% (p/v), na produção de carotenoides pela *Archaea Haloferax alexandrinus* também foi avaliada. A *Archaea* cresceu com pequena pigmentação no meio sem cloreto de potássio. Com o aumento da concentração deste sal até 0,2% (p/v), ocorreu maior produção de células e de carotenoides. Porém, em concentrações acima de 0,2% (p/v) de cloreto de potássio, houve um decréscimo da



produção de células e de carotenoides. A necessidade do micro-organismo por cloreto de potássio já era esperada visto que este sal é essencial para a manutenção do equilíbrio osmótico das células. (ASKER e OHTA, 1999).

A demanda por elementos-traço pela *Archaea Haloferax alexandrinus* foi outro fator nutricional avaliado por Asker e Ohta (1999). A *Archaea* produziu mais células e carotenoides na presença destes elementos-traço ( $2,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de cloreto ferroso,  $7 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de cloreto de cálcio hepta-hidratado,  $0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de sulfato de manganês hidratado,  $0,44 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de sulfato de zinco e  $0,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de sulfato de cobre penta-hidratado), provavelmente devido à necessidade dos íons ferro, manganês e zinco.

As condições de cultivo envolvendo efeito de temperatura ( $15^\circ\text{C}$  a  $55^\circ\text{C}$ , em intervalos de  $5^\circ\text{C}$ ) e pH (4,5 a 9) também foram testadas. A temperatura e o pH são fatores ambientais que afetam significativamente o crescimento e a formação de produtos nos micro-organismos. A temperatura pode modificar a quantidade de carotenoides produzida pelos micro-organismos devido à alteração na concentração das enzimas envolvidas na síntese dos carotenoides. (BHOSALE, 2004). Por sua vez, o pH pode controlar a estabilidade das macromoléculas dos micro-organismos. Seu efeito no crescimento celular e na formação de produto pode variar de acordo com o micro-organismo, a composição do meio e as condições de cultivo. (HU et al., 2006). A produção de células e de carotenoides pela *Archaea Haloferax alexandrinus* ocorreu em temperaturas entre  $20^\circ\text{C}$  e  $50^\circ\text{C}$ , bem como em pH entre 5 e 7,5. Os valores máximos foram verificados na temperatura de  $37^\circ\text{C}$  e em pH 7,2. (ASKER e OHTA, 1999). Em temperatura moderada, a membrana celular das *Archaea* halofílicas pode ser menos permeável à difusão dos íons sódio do que em altas temperaturas. Com isso, a *Archaea* consegue manter mais facilmente a concentração adequada de sódio intracelular. Em pH neutro ou aproximadamente neutro, a *Archaea* halofílica pode manter seu gradiente de pH e sua ótima força próton-motiva, o que não ocorreria em meios com valor de pH alcalino. (BOWERS e WIEGEL, 2011). As *Archaea Halobacterium* SP-2 e *Halorubrum* SP-4, após cultivos em valores de pH entre 6 e 9, produziram a maior concentração celular e de carotenoides em meios com pH 7 e 8, respectivamente, confirmando a preferência de *Archaea* halofílicas por pH neutro ou aproximadamente neutro. (SUI, LIU e DENG, 2014).

Outras variáveis testadas foram a velocidade de agitação e volume de meio nos frascos. Em cultivo sob agitação, a *Archaea Haloferax alexandrinus* apresentou alta concentração celular e de carotenoides. Contrariamente, no cultivo sem agitação,

o crescimento foi pequeno e não houve produção de carotenoides. Além disso, máximo crescimento e produção de carotenoides foi observado em cultivo sob agitação em frascos de Erlenmeyer contendo 100 mL de meio quando comparado a frascos contendo 200 mL, 300 mL e 400 mL de meio. Estes resultados já eram esperados visto que *Haloferax alexandrinus* é uma *Archaea* aeróbia. (ASKER e OHTA, 1999). Geralmente, a taxa de transferência de oxigênio aumenta com a maior velocidade de agitação e com um menor volume de líquido no frasco, influenciando no crescimento e na produção de metabólitos. (LIU, WU e HO, 2006; STANBURY, WHITAKER e HALL, 1995).

Após a finalização do processo de otimização, foi estabelecido que o cultivo da *Archaea Haloferax alexandrinus* deve ser realizado em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultivo constituído por 1% de extrato de levedura, 0,75% de casaminoácidos, 25% de cloreto de sódio, 4% de sulfato de magnésio, 0,2% de cloreto de potássio e elementos-traço, em pH 7,2, temperatura de 37 °C, sob agitação por 6 dias. Nestas condições, a *Archaea* é capaz de produzir 2,06 mg de carotenoides totais g<sup>-1</sup> de células secas, destes 2,94% são de  $\beta$ -caroteno, 33,88% de cantaxantina e 63,17% de bacteriorruberinas. (ASKER e OHTA, 1999).

Alternativamente, a *Archaea* halofílica *Halorubrum* sp. TBZ126 teve sua produção de células e de carotenoides otimizada por meio da metodologia de superfície de resposta por Hamidi et al. (2014). Para isto, os efeitos da temperatura (15 °C a 50 °C), do pH (4 a 10) e da concentração de cloreto de sódio (2,5% a 30%, p/v) foram avaliados. As condições ótimas para a produção de células e de carotenoides foram as temperaturas de 31 °C e 32 °C, valores de pH de 7,51 e 7,94 e concentrações de cloreto de sódio de 18,33% e 20,55% (p/v), respectivamente. Portanto, as maiores concentrações de células e de carotenoides também ocorreram em temperatura moderada e valores de pH aproximadamente neutros como ocorreu com *Haloferax alexandrinus* TM (JCM 10717<sup>T</sup>). Nas condições ótimas, foram produzidos  $0,9 \pm 0,01$  g de células L<sup>-1</sup> e  $11,71 \pm 0,01$  mg de carotenoides L<sup>-1</sup>, respectivamente. As concentrações aumentaram quando o micro-organismo foi cultivado na presença de luz (lâmpada fluorescente branca Dulux® de 36 Watt) nas condições otimizadas. A máxima concentração de carotenoide de  $16,35 \pm 0,01$  mg L<sup>-1</sup> foi produzida na presença de luz na condição otimizada para a produção de carotenoides. A bacteriorruberina foi identificada como o carotenoide majoritário

(mais de 96% do total de carotenoides); o licopeno e o  $\beta$ -caroteno estavam presentes em menor quantidade (menos de 2% cada um).

### 3.3.5 Produção de carotenoides em cultivos em dois estágios

Fang et al. (2010) utilizaram a *Archaea* halofílica *Haloferax mediterranei* para um cultivo em dois estágios. No primeiro estágio, a *Archaea* foi crescida em um meio de cultivo (QUADRO 1) contendo 15,6% (p/v) de cloreto de sódio. As células obtidas neste estágio foram separadas e empregadas no cultivo de segundo estágio (QUADRO 1), realizado para a produção de carotenoides. Os carotenoides C<sub>50</sub> bacteriorrubrina, monoanidrobacteriorrubrina, bisanidrobacteriorrubrina e o carotenoide C<sub>45</sub> 2-isopentenil-3,4-dehidrorodopina foram identificados nos extratos obtidos do cultivo de segundo estágio. Foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de cloreto de sódio (5%, 10% e 20%, p/v) no rendimento de carotenoides. Com a diminuição da concentração de cloreto de sódio, houve um aumento na produção de carotenoides. *Haloferax mediterranei* produziu maior concentração de carotenoides (0,117 A<sub>494nm</sub> mL<sup>-1</sup> de cultivo) em meio contendo 5% de cloreto de sódio (concentração similar àquela produzida no meio com 10% de cloreto de sódio) quando comparado ao meio contendo 20% (p/v) de cloreto de sódio (0,056 A<sub>494nm</sub> mL<sup>-1</sup> de cultivo) e ao cultivo em um único estágio (0,095 A<sub>494nm</sub> mL<sup>-1</sup> de cultivo). Como parte das células sofreram lise no meio contendo 5% (p/v) cloreto de sódio, diferentes concentrações de sulfato de magnésio foram utilizadas no cultivo de segundo estágio para modificar a pressão osmótica do meio. A produção de carotenoides aumentou à medida que aumentava a concentração de sulfato de magnésio. A maior produção (0,342 A<sub>494nm</sub> mL<sup>-1</sup> de cultivo) foi verificada na concentração de 8% (p/v) do sal. Este foi o primeiro relato de que o sulfato de magnésio associado à baixa concentração de cloreto de sódio poderia reduzir a lise celular e aumentar a produção de pigmentos na *Archaea Haloferax mediterranei*. Considerando que a produção de carotenoides ocorre pela via do mevalonato e tem como precursor o acetato, foi utilizado o acetato de sódio, nas concentrações de 0,1%, 0,5%, 1% e 2% (p/v), ao invés de glucose como fonte de carbono no cultivo de segundo estágio. O acetato poderia promover diretamente a síntese de mevalonato e, consequentemente, de carotenoides C<sub>50</sub>. O emprego de acetato de sódio no meio de cultivo forneceu a concentração de carotenoides de 0,604 A<sub>494nm</sub> mL<sup>-1</sup> de cultivo,

representando um aumento de 92% quando comparado com a utilização de 0,1% (p/v) de glicose ( $0,314 A_{494nm} \text{ mL}^{-1}$  de cultivo). O rendimento de carotenoides diminuiu quando concentrações de glicose e acetato de sódio excederam 2% e 1% (p/v), respectivamente. Finalmente, a maior concentração de carotenoides foi observada após 48 horas de cultivo no segundo estágio utilizando como inóculo as células cultivadas por 80 horas no primeiro estágio. Entretanto, a maior eficiência na produção de carotenoides foi obtida no cultivo de 48 horas no segundo estágio realizado com as células cultivadas pelo mesmo período de tempo no primeiro estágio.

### 3.4 ARCHAEA HALOFÍLICA *Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™)

A *Archaea* halofílica *Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) (do latim *saccharum*, açúcar, e *vorare*, comer) pertence à família *Halobacteriaceae*. (CATALOGUE OF LIFE, 2012; TOMLINSON e HOCHSTEIN, 1972).

O micro-organismo *Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) foi isolado das salinas da área da Baía de São Francisco, no Estado da Califórnia, nos Estados Unidos da América. (TOMLINSON e HOCHSTEIN, 1972). Desde tempos antigos as salinas têm sido alvo de atenção. Sugere-se que a primeira Praga do Egito, na qual a água do Rio Nilo adquiriu cor de sangue, refere-se à presença de águas vermelhas, que, atualmente, sabe-se que são causadas por densas comunidades de micro-organismos adaptados à vida em altas concentrações de sais ou concentrações próximas da saturação. Ainda em tempos modernos, o Mar Morto tem mostrado a presença de micro-organismos halófilos do domínio *Archaea* em quantidade suficiente para conferir cor vermelha à água. (OREN, 2002b).

O micro-organismo *Halorubrum saccharovorum* caracteriza-se por um bacilo móvel, Gram negativo, medindo  $0,6-1,25 \times 2,5 \mu\text{m}$ , que necessita de pelo menos 12% de cloreto de sódio no meio em que se encontra para manter sua integridade estrutural e é capaz de metabolizar diferentes carboidratos, produzindo ácidos. Em meio sólido, suas colônias são pequenas (menores que 2 mm), redondas, convexas, inteiras e de coloração vermelho-alaranjada. Este pigmento vermelho foi identificado como sendo a bacteriorrubrina, um carotenoide contendo 50 átomos de carbono. (KUSHWAHA et al., 1982; TOMLINSON e HOCHSTEIN, 1972, 1976).

A bacteriorrubrina e seus derivados, a monoanidrobacteriorrubrina, a bisanidrobacteriorrubrina e a trisanidrobacteriorrubrina, são os carotenoides mais

importantes e representativos do grupo dos carotenoides com 50 átomos de carbono. (PFANDER, 1994). Estes compostos podem ser encontrados na forma de isômeros geométricos *cis* ou *trans*. (RØNNEKLEIV e LIAAEN-JENSEN, 1992).

As funções do pigmento bacteriorrubrina para os micro-organismos da família *Halobacteriaceae* incluem a proteção contra danos causados por altas intensidades das radiações visível e ultravioleta, assim como das radiações ionizantes e da exposição ao peróxido de hidrogênio, reforço da membrana celular e remoção de radicais livres hidroxila. (FANG et al., 2010; OREN, 2002c; SINGH e GABANI, 2011). Muitos autores mostraram que a bacteriorrubrina e seus derivados produzidos por *Archaea* halofílicas tem uma função extraordinária para mantê-los vivos em ambientes de estresse extremo. Por isso, os carotenoides com 50 átomos de carbono podem ser úteis para uma aplicação prática. (FANG et al., 2010).

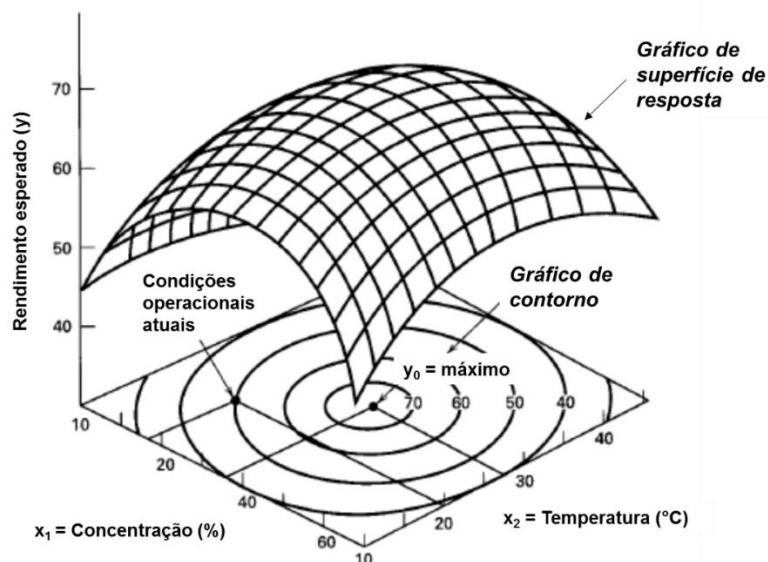
### 3.5 OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS EMPREGANDO PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS FATORIAIS

A metodologia de superfície de resposta ou *Response Surface Methodology* (RSM) caracteriza-se por uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais. Tem sido utilizada com sucesso na criação de modelos matemáticos aplicáveis a diferentes processos industriais desde a década de 1950, quando foi introduzida por G. E. P. Box. (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010).

Por meio de técnicas matemáticas e estatísticas, a metodologia de superfície de resposta cria modelos e analisa problemas nos quais a resposta de interesse sofre a influência de diversas variáveis. Geralmente, a superfície de resposta é mostrada em um gráfico tridimensional (FIGURA 6). Para facilitar a visualização da forma de uma superfície de resposta, frequentemente são criados gráficos de contorno em duas dimensões (FIGURA 6). (MONTGOMERY, 2001).

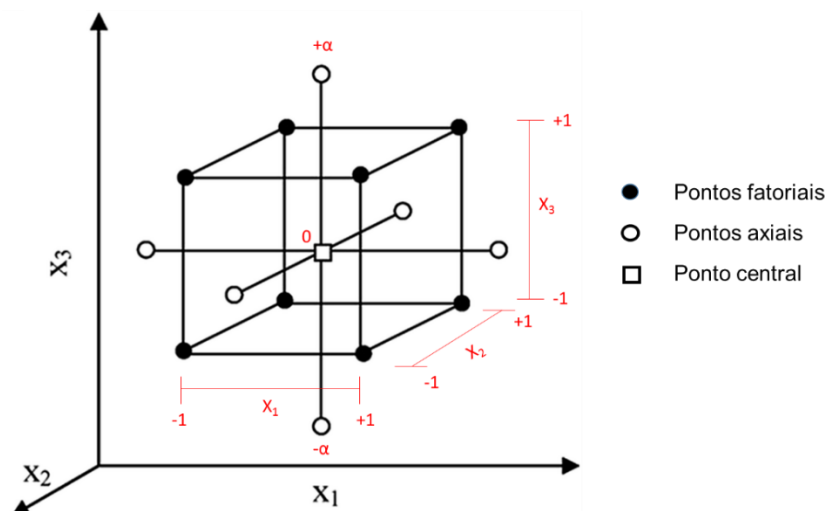
A metodologia de superfície de resposta estabelece uma função polinomial, geralmente de baixa ordem, para descrever a relação entre a resposta e as variáveis independentes. Usualmente, são utilizados modelos de primeira ou segunda ordem. Um modelo de primeira ordem é utilizado quando uma função linear é capaz de descrever o sistema. Quando existe uma curvatura no sistema, uma função polinomial de maior grau deve ser utilizada, como o modelo de segunda ordem. (MONTGOMERY, 2001).

FIGURA 6 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA TRIDIMENSIONAL E GRÁFICO DE CONTORNO EM DUAS DIMENSÕES MOSTRANDO O RENDIMENTO ESPERADO DE UM PROCESSO ( $y$ ) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ( $x_1$ ) E DA TEMPERATURA ( $x_2$ )



FONTE: Modificado de MONTGOMERY (2001).

O delineamento composto central é o projeto mais utilizado para ajustar os modelos de segunda ordem. Comumente, consiste de um projeto  $2^k$ , no qual “k” variáveis são avaliadas em dois níveis (valores “baixo” (-1) e “alto” (+1) das variáveis). O número total de rodadas neste projeto corresponde a  $2^k$  pontos fatoriais,  $2 \times k$  pontos axiais e um número arbitrário de repetições do ponto central. Os pontos fatoriais correspondem a todas as combinações possíveis dos níveis das variáveis. Os pontos axiais garantem a rotacionalidade ao projeto e seus valores são definidos a partir da determinação do valor de  $\alpha$ , sendo  $\alpha = (2^k)^{1/4}$ . O ponto central (0) fornece informações sobre o comportamento das respostas entre os níveis inicialmente atribuídos às variáveis e as replicadas do ponto central são responsáveis pela estimativa do erro e evidenciam a qualidade da repetibilidade do processo. Como exemplo, o delineamento composto central  $2^3$ , representado geometricamente na FIGURA 7, é composto por 8 pontos fatoriais ( $2^3 = 8$ ), 6 pontos axiais ( $2 \times 3 = 6$ ) e o ponto central. A matriz deste delineamento  $2^3$  (QUADRO 2) indica as combinações dos níveis das variáveis que originam todas as rodadas do projeto. (MONTGOMERY, 2001; NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010; RODRIGUES e IEMMA, 2005).

FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL  $2^3$ 

FONTE: Modificado de KORANY et al. (2015); MONTGOMERY (2001).

NOTA:  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  representam as três variáveis independentes do delineamento composto central  $2^3$  constituído por 3 fatores em 2 níveis. Os valores -1, 0 e +1 representam o valor baixo, o valor central e o valor alto de cada variável ( $X_1$ ,  $X_2$  ou  $X_3$ ), respectivamente, enquanto  $-\alpha$  e  $+\alpha$  indicam o valor baixo e o valor alto dos pontos axiais, respectivamente.

QUADRO 2 – MATRIZ DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL  $2^3$ 

Rodada	Variável			
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	
1	-1	-1	-1	Pontos fatoriais
2	+1	-1	-1	
3	-1	+1	-1	
4	+1	+1	-1	
5	-1	-1	+1	
6	+1	-1	+1	
7	-1	+1	+1	
8	+1	+1	+1	
9	+1,68	0	0	Pontos axiais
10	-1,68	0	0	
11	0	+1,68	0	
12	0	-1,68	0	
13	0	0	+1,68	
14	0	0	-1,68	Ponto central
15	0	0	0	

FONTE: Modificado de MYERS, MONTGOMERY e ANDERSON-COOK (2009).

NOTA:  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  representam as três variáveis independentes do delineamento composto central  $2^3$  constituído por 3 fatores em 2 níveis. Os valores -1, 0 e +1 representam o valor baixo, o valor central e o valor alto de cada variável ( $X_1$ ,  $X_2$  ou  $X_3$ ), respectivamente, enquanto -1,68 e +1,68 indicam o valor baixo e o valor alto dos pontos axiais, respectivamente, visto que  $\alpha = (2^3)^{1/4} = 1,68$ .

A análise de variância pode ser utilizada para determinar a magnitude e a direção dos efeitos das variáveis, informando quais variáveis são importantes para o processo. O efeito de uma variável caracteriza-se pela mudança na resposta

produzida pela alteração no nível da variável, e é chamado de efeito principal. Os efeitos de interação, por sua vez, indicam que o efeito de um fator depende do nível de outro(s) fator(es), ou seja, indicam que os fatores interagem para fornecer a resposta. Os efeitos principais perdem seu significado quando estão envolvidos em efeitos de interação significativos. (MONTGOMERY, 2001; MYERS, MONTGOMERY e ANDERSON-COOK, 2009; NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010).

Os coeficientes fornecidos pela análise de variância dos dados permitem criar a equação de regressão que descreve o modelo. Esta equação é maximizada ou minimizada, conforme o caso, para determinar os valores ótimos das variáveis que fornecerão a resposta otimizada para o processo.

A metodologia de superfície de resposta tem sido utilizada para otimizar diferentes processos biotecnológicos empregando micro-organismos, como a produção de biomassa (MANIKANDAN, PAŠIĆ e KANNAN, 2009), de enzimas (SÁNCHEZ BLANCO et al., 2016) e de diferentes metabólitos, como os carotenoides (LIU e WU, 2007), fornecendo uma alternativa para aumentar a eficiência dos processos microbianos.

### 3.6 NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs)

A nanotecnologia é uma área com crescente interesse visto que a diminuta dimensão dos nanomateriais, entre 1 e 100 nm, reflete em mudanças nas suas propriedades físicas, químicas ou biológicas que, por sua vez, permitem o desenvolvimento de novas ou aprimoradas propriedades ou funções. Dentre os nanomateriais, diversas nanopartículas metálicas apresentam notáveis propriedades antibacterianas. As nanopartículas de prata, ouro, platina, titânio, paládio, ferro, alumínio e cobre são as que têm demonstrado crescente importância. (AHMED et al., 2016; SHARMA, YNGARD e LIN, 2009).

As nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido alvo de várias pesquisas devido à sua ampla gama de propriedades. Podem ser empregadas na síntese de dispersões coloidalmente estáveis, que são úteis em áreas como a fotografia, a catálise, os sensores biológicos, a fotônica, a optoeletrônica; e como agentes terapêuticos, destacando-se os efeitos como agentes antibacterianos, antifúngicos, antivirais, anti-inflamatórios e anticâncer. Devido ao seu amplo espectro de atuação como antimicrobiano, as AgNPs apresentam aplicações biomédicas e ambientais bem como



em cosméticos, vestuário e produtos de consumo. (OTARI et al., 2012, 2014; TALEKAR et al., 2016).

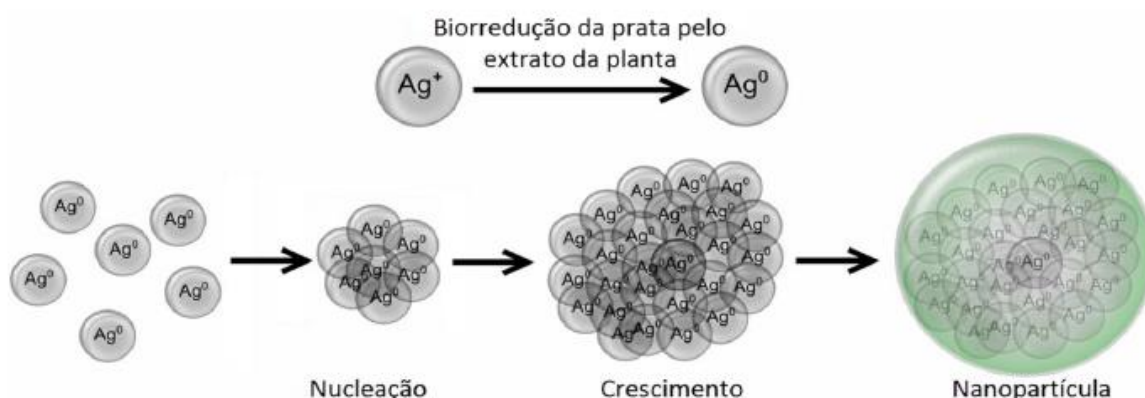
As AgNPs são comumente sintetizadas por meio de duas estratégias: *top-down* (de cima para baixo) ou *bottom-up* (de baixo para cima). As técnicas *top-down* envolvem o emprego de metodologias especializadas, como a litografia ou ablação a laser, para a diminuição mecânica do tamanho da prata metálica da sua forma bruta para a nanoescala. Já as técnicas *bottom-up* também conhecidas como auto-montagem, compreendem a dissolução de sal de prata em um solvente e a adição de um agente redutor para que os átomos e moléculas sejam estruturados em materiais em nanoescala. As técnicas *bottom-up* geralmente envolvem a síntese química ou biológica de nanopartículas. (NARAYANAN e SAKTHIVEL, 2010; TOLAYMAT et al., 2010).

Os métodos físicos e químicos empregados para a síntese de nanopartículas utilizam substâncias químicas tóxicas, como agentes redutores, solventes orgânicos ou agentes estabilizadores não biodegradáveis que são potencialmente perigosos para o meio ambiente e para os sistemas biológicos. Alguns destes métodos podem apresentar ainda baixa conversão de materiais, requerimento de energia alto e procedimentos de purificação difíceis e laboriosos, bem como problemas de estabilidade das nanopartículas, de crescimento controlado dos cristais e de agregação das nanopartículas. (NARAYANAN e SAKTHIVEL, 2010; SUNKAR e NACHIYAR, 2011). Por isso, mundialmente, há um crescente aumento na busca de rotas de síntese verde de nanopartículas. Estas rotas consistem na utilização de sistemas biológicos como leveduras, fungos, bactérias e extratos de plantas para a obtenção das nanopartículas e são consideradas seguras, sustentáveis e ambientalmente amigáveis. (NARAYANAN e SAKTHIVEL, 2010; ROY et al., 2013).

A síntese verde de AgNPs inclui a seleção de um meio solvente (geralmente água), um agente redutor (por exemplo, um organismo biológico ou parte dele) e um agente estabilizante atóxico que previne a agregação das nanopartículas e controla o seu tamanho final. (ROY et al., 2013). Os micro-organismos são comumente compostos por diferentes tipos de substâncias que podem desempenhar a função de redução de íons prata ( $\text{Ag}^+$ ) a prata metálica ( $\text{Ag}^0$ ) e possibilitar a estabilização das AgNPs pela atuação como agente estabilizante. (PHONGTONGPASUK, POADANG e YONGVANICH, 2016). A FIGURA 8 é um esquema representativo da formação das AgNPs utilizando rotas de síntese verde, considerando a teoria de nucleação e

crescimento mediada por átomos neutros. Esta teoria, primeiramente estabelecida por Lamer e Dinegar, em 1950, considera que o processo de nucleação e crescimento de nanopartículas metálicas ocorre em três estágios: produção dos átomos neutros, nucleação a partir da agregação dos átomos e crescimento pela adição de átomos. No primeiro estágio, os átomos metálicos são produzidos pela redução dos íons metálicos na presença de agentes redutores. No segundo estágio, os átomos começam a se agregar para formar pequenos aglomerados estáveis e, no terceiro estágio, devido à contínua adição de átomos metálicos, ocorre o aumento gradual do tamanho dos aglomerados até a completa formação da nanopartícula. Outras teorias, baseadas na nucleação e crescimento de nanopartículas mediada por átomos e, posteriormente, mediadas por aglomerados, foram desenvolvidas. (YOU e FANG, 2016).

FIGURA 8 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA FORMAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR SÍNTESE VERDE EMPREGANDO EXTRATO DE PLANTA



FONTE: ALBERNAZ (2014).

As rotas de síntese verde microbianas são consideradas promissoras porque o uso e formação de subprodutos tóxicos podem ser diminuídos e/ou eliminados bem como vários fatores, como métodos de cultivo microbiano e técnicas de extração, podem ser otimizados para a síntese rápida de nanopartículas. (OTARI et al., 2014). Diferentes gêneros de bactérias, como *Pseudomonas* e *Bacillus*, fungos, como *Aspergillus* e *Penicillium*, e leveduras, como *Yarrowia* e *Candida*, foram utilizados para a síntese de AgNPs. Os micro-organismos podem produzir nanopartículas intracelulares ou extracelulares. Os mecanismos para a síntese intracelular e extracelular são diferentes de acordo com os agentes biológicos utilizados e a síntese

intracelular envolve um transporte especial de íons na célula microbiana. (HULKOTI e TARANATH, 2014; SINGH et al., 2016).

O estudo de uma alternativa para a síntese verde de AgNPs utilizando a *Archaea* halofílica *Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) ainda não foi descrito na literatura e poderá fornecer um novo produto eco-amigável à sociedade, além de demonstrar uma aplicação racional para os carotenoides produzidos por este micro-organismo.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MICRO-ORGANISMO

A *Archaea* halofílica *Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) foi isolada das salinas da Baía de São Francisco, Califórnia, Estados Unidos da América, por Tomlinson e Hochstein (1972) e depositada na coleção *American Type Culture Collection* (ATCC), Rockville, Maryland, Estados Unidos da América, de onde foi adquirida para o desenvolvimento deste trabalho.

### 4.2 MEIOS DE CULTURA

O meio líquido basal utilizado nos cultivos é constituído por 250 g.L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio (Biotec), 5 g.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada (BBL), 5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura (Micromed), 20 g.L<sup>-1</sup> de cloreto de magnésio hexa-hidratado (Vetec), 2 g.L<sup>-1</sup> de cloreto de potássio (Vetec), 0,2 g.L<sup>-1</sup> de cloreto de cálcio di-hidratado (Merck), pH de 7,6 ± 0,005 (ATCC, 2011), ajustado com solução aquosa de hidróxido de sódio (Vetec) 5 mol.L<sup>-1</sup>. Foram preparados meios com diferentes concentrações de cloreto de sódio, mantendo-se inalteradas as concentrações dos outros componentes, e com diferentes valores de pH inicial, ajustados com solução aquosa de hidróxido de sódio (Vetec) 5 mol.L<sup>-1</sup> ou solução aquosa de ácido sulfúrico (Neon) 1 mol.L<sup>-1</sup>.

Os componentes dos meios de cultura foram pesados na balança analítica eletrônica Bioprecisa® FA 2104N, na balança semianalítica Shimadzu® BL 3200H ou na balança eletrônica Marte® AS2000. O pH dos meios de cultura foi verificado e ajustado, quando necessário, utilizando o potenciômetro Tecnopon® mPA 210.

Os meios de cultura foram distribuídos em frascos de Erlenmeyer e esterilizados em autoclave vertical Phoenix® AV50 30 L empregando-se calor úmido na temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm. O tempo de esterilização foi definido a partir do volume do frasco e do volume de meio contido no frasco.

### 4.3 CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DO MICRO-ORGANISMO

As células da *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) contidas em um microtubo e conservadas por congelamento na temperatura de -20 °C foram

separadas por centrifugação a 7378 x g durante 6 minutos na centrífuga Sigma® 1-14 para a remoção do agente crioprotetor. O microtubo foi aberto em cabine de segurança biológica Classe II Tipo B2 (Labconco), o sobrenadante descartado e substituído por meio basal líquido. Após a homogeneização das células, o conteúdo do microtubo foi transferido para um frasco de Erlenmeyer de 50 mL de capacidade contendo 10 mL de meio líquido basal. O frasco inoculado com as células descongeladas foi colocado na incubadora refrigerada de movimento orbital Novatécnica®, modelo NT 715, sob temperatura de 37 °C e agitação de 150 rpm. Após a visualização do crescimento celular, todo o cultivo foi transferido para dois frascos de Erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 50 mL de meio líquido basal pH  $7,6 \pm 0,005$ . Estes frascos inoculados foram mantidos na mesma incubadora sob temperatura de 37 °C e agitação de 150 rpm até o final da fase exponencial de crescimento (48 horas). Em seguida, foi verificada a ausência de micro-organismos contaminantes nos cultivos e as características microscópicas da *Archaea* por técnica a fresco e coloração de Gram, conforme descrito por Tortora, Funke e Case (2012b) e Bier (1980), respectivamente, utilizando microscópio óptico Olympus® CX41.

Os dois cultivos de 50 mL contendo as células recém-crescidas foram distribuídos em microtubos de polipropileno estéreis de 2 mL de capacidade. Estes microtubos foram submetidos à centrifugação a 7378 x g por 2 minutos na centrífuga Sigma® 1-14 e, em seguida, o sobrenadante de cada um dos microtubos foi descartado. Ao precipitado de células, foram adicionados 850 µL de meio líquido basal pH  $7,6 \pm 0,005$  e 150 µL de glicerol, utilizado como agente crioprotetor. Os tubos contendo as células foram homogeneizados e conservados na temperatura de -20 °C em freezer Consul® para a manutenção da viabilidade das células do micro-organismo.

#### 4.4. DESENVOLVIMENTO DO INÓCULO

Para o desenvolvimento do inóculo, a *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) foi crescida novamente a partir das células conservadas por congelamento, presentes em um microtubo, até o final da fase exponencial de crescimento conforme descrito na seção 4.3. Após 48 horas, um dos cultivos de 50 mL contido no frasco de Erlenmeyer de 250 mL foi transferido para frasco de Erlenmeyer de 2000 mL contendo 450 mL de meio líquido basal com os constituintes calculados

para 500 mL de meio. Este frasco foi mantido em incubadora refrigerada de movimento orbital Tecnal, modelo TE-421, sob temperatura de 37 °C, agitação de 150 rpm durante 48 horas. Em seguida, o cultivo foi centrifugado a 7012 x *g* por 15 minutos na centrífuga Sigma, modelo 3-16P. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas utilizando um meio de cultivo com a mesma composição do meio de cultivo em que seriam inoculadas. A suspensão de células recém-preparada foi quantificada pelos métodos turbidimétrico e gravimétrico e empregada para iniciar os cultivos.

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO DA MASSA MICROBIANA NA SUSPENSÃO DE CÉLULAS

Para a determinação da massa microbiana da suspensão de células da *Archaea* pelo método turbidimétrico, uma alíquota de 1,5 mL foi transferida para um microtubo. O microtubo foi submetido a centrifugação a 7378 x *g* por 5 minutos na centrífuga Sigma® 1-14 e, em seguida, o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado, foi adicionado 1,5 mL de solução de cloreto de sódio 25% (p/v) e, após a homogeneização da amostra, foi realizada a leitura da densidade óptica (DO) a 540 nm em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV1601PC.

A densidade óptica da suspensão de células, obtida pelo método turbidimétrico, foi relacionada com a quantidade de células secas (g.L<sup>-1</sup>) por meio de uma curva padrão previamente construída.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS PARA O CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES PELA *ARCHAEA Halorubrum saccharovorum*

Para verificar em que condições experimentais ocorre o crescimento e a produção de carotenoides pela *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) e estabelecer os valores mínimos e máximos destas condições, foram realizados cultivos em diferentes concentrações de cloreto de sódio, valor de pH inicial e temperatura.

Os cultivos foram iniciados com a concentração celular de 0,33 g.L<sup>-1</sup> (seções 4.4 e 4.5), foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de meio basal líquido com concentração de 5 a 25% (p/v) de cloreto de sódio ou pH inicial entre 5 e 9 e foram mantidos em incubadora refrigerada de movimento orbital

Novatécnica®, modelo NT 715, em temperaturas entre 25 °C e 55 °C, a 150 rpm durante 120 horas. A TABELA 2 mostra todos os cultivos realizados, evidenciando que somente uma condição (concentração de cloreto de sódio, valor de pH inicial ou temperatura) foi modificada em cada cultivo, as outras duas condições foram mantidas nas condições estabelecidas para o crescimento do micro-organismo. Nos cultivos em diferentes concentrações de cloreto de sódio, o pH inicial do meio de cultivo foi 7,6 e a temperatura de cultivo foi de 37 °C; nos cultivos em diferentes valores iniciais de pH do meio, a concentração de cloreto de sódio do meio de cultivo foi de 25% (p/v) e a temperatura de cultivo foi de 37 °C; e nos cultivos realizados em diferentes temperaturas, a concentração de cloreto de sódio do meio de cultivo foi de 25% (p/v) e o pH inicial do meio de cultivo foi 7,6.

TABELA 2 - CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE CLORETO DE SÓDIO, VALORES DE pH INICIAL E TEMPERATURAS EMPREGADOS NOS CULTIVOS UTILIZADOS PARA VERIFICAR O CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES PELA ARCHAEA *Halorubrum saccharovorum* ATCC® 29252™

Cultivo	Condições de cultivo		
	NaCl (%, p/v)	pH inicial	Temperatura (°C)
1	5	7,6	37
2	10	7,6	37
3	15	7,6	37
4	20	7,6	37
5	25	7,6	37
6	25	5	37
7	25	6	37
8	25	7	37
9	25	8	37
10	25	9	37
11	25	7,6	25
12	25	7,6	35
13	25	7,6	45
14	25	7,6	55

FONTE: O autor (2016).

Ao término dos cultivos independentes, realizados em triplicata, as células foram separadas e as concentrações de células e de carotenoides totais foram determinadas.

#### 4.7 VERIFICAÇÃO DO EFEITO DA LUZ NO CRESCIMENTO E NA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES PELA *ARCHAEA Halorubrum saccharovorum*

Para verificar o efeito da luz no crescimento e na produção de carotenoides pela *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™), foram realizados cultivos, em triplicata, na ausência de luz e na presença de luz (entre 5200 LUX e 5300 LUX, medida com luxímetro digital MLM-1332), fornecida por três lâmpadas fluorescentes Osram Duluxtar de 22 Watts.

Os cultivos iniciaram com a concentração celular de 0,33 g.L<sup>-1</sup> (seções 4.4 e 4.5) e foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de meio basal líquido com concentração de cloreto de sódio de 25% (p/v), pH inicial de 7,6, temperatura de 37 °C a 150 rpm durante 120 horas em incubadora refrigerada de movimento orbital Novatécnica®, modelo NT 715.

#### 4.8 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS SECAS

As células foram separadas dos meios de cultivo por centrifugação a 7012 x g por 15 minutos na centrífuga Sigma, modelo 3-16P. Os sobrenadantes foram descartados e as células presentes nos precipitados foram congeladas na temperatura de -20 °C e secas em liofilizador de bancada, marca Operon. As células secas foram quantificadas e utilizadas para extração, identificação e quantificação de carotenoides.

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

A determinação da concentração celular nos cultivos foi realizada pelo método gravimétrico, técnica do peso seco. As células foram separadas do cultivo como descrito na seção 4.8 e as células secas obtidas foram pesadas em balança analítica Bioprecisa modelo FA-2104N. A concentração de células secas foi expressa em g.L<sup>-1</sup>.



#### 4.10 EXTRAÇÃO DOS CAROTENOIDES

As células secas do micro-organismo *Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) provenientes de cada cultivo foram trituradas em um tubo de centrifuga com o auxílio de uma espátula. Foram adicionados entre 100 µL e 200 µL de água destilada aos tubos. Após a homogeneização da suspensão de células em agitador vortex Biomixer® e repouso por 5 minutos, foram adicionados 1,3 mL de metanol (J.T.Baker). As suspensões de células foram novamente homogeneizadas, permaneceram em contato com o solvente por 20 minutos e o sobrenadante foi separado por centrifugação a 7012 x *g* por 15 minutos em centrífuga Sigma, modelo 3-16P. O processo de extração foi repetido até que as células estivessem despigmentadas. Os sobrenadantes foram reunidos em um tubo de ensaio, foi adicionado 2 mL de água destilada e 2 mL de hexano (Panreac) para que os carotenoides fossem transferidos por partição da fase metanólica para a fase hexânica. Os extratos hexânicos foram reunidos em tubos de centrifuga e secos no concentrador de amostras Centrivap, marca Labconco, na temperatura de 35°C.

Os extratos secos obtidos foram solubilizados em éter de petróleo (ponto de ebulição entre 40 e 60 °C) (Carlo Erba) para a quantificação dos carotenoides por espectrofotometria na região do UV-Vis.

#### 4.11 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS

A concentração total de carotenoides nos extratos em éter de petróleo obtidos conforme descrição na seção 4.10 foi determinada em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV1601PC, a 494 nm, utilizando cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm (Shimadzu). O valor de 2350 para a absortividade específica ( $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ ) da bacteriorrubrina, carotenoide majoritário no extrato da *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™), foi empregado para o cálculo da concentração de carotenoides totais. (BRITTON, 1995b; DAVIES, 1976). Assim, considerando que  $A_{1\text{ cm}}^{1\%} = 2350$ , ou seja, que uma solução de concentração 1% ou 0,01 g.mL<sup>-1</sup> apresenta absorbância de 2350, a concentração de carotenoides totais foi calculada da seguinte maneira:

$$\begin{array}{rcl}
 0,01 \text{ g mL}^{-1} & \text{-----} & 2350 \\
 1 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1} & \text{-----} & 0,2350 \\
 x & \text{-----} & A_{\text{amostra}} \\
 \\ 
 x \text{ } \mu\text{g} & \text{-----} & 1 \text{ mL} \\
 z \text{ } \mu\text{g} & \text{-----} & y \text{ mL} \\
 \\ 
 z \text{ } \mu\text{g} & \text{-----} & w \text{ g de células secas (peso seco)} \\
 m & \text{-----} & 1 \text{ g de células secas}
 \end{array}$$

onde x é a concentração de carotenoides totais em 1 mL de extrato solubilizado em éter de petróleo ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ),  $A_{\text{amostra}}$  é a absorbância da amostra, y é o volume total (mL) de extrato solubilizado em éter de petróleo, z é a massa ( $\mu\text{g}$ ) de carotenoides totais existente no volume total de extrato solubilizado em éter de petróleo, w é a massa (g) de células secas na amostra e m é concentração de carotenoides totais por grama de células secas ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), unidade na qual foi expressa a concentração de carotenoides totais nos cultivos da *Archaea Halorubrum saccharovorum*.

#### 4.12 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CÉLULAS E DE CAROTENOIDES PELA *ARCHAEA Halorubrum saccharovorum*

O planejamento experimental foi realizado após o estabelecimento dos valores mínimos e máximos das condições concentração de cloreto de sódio, valor de pH inicial e temperatura nas quais ocorrem o crescimento e a produção de carotenoides pela *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™). Estes valores foram obtidos a partir dos cultivos realizados conforme a descrição na seção 4.6. A metodologia de superfície de resposta foi empregada para a otimização da produção de células e de carotenoides pela *Archaea*. Um delineamento composto central rotacional, criado e analisado utilizando o programa estatístico Minitab® 16, foi elaborado com três fatores controláveis (concentração de cloreto de sódio, valor de pH inicial e temperatura), contemplando um projeto fatorial  $2^k$  ( $2^3 = 8$  ensaios; o qual se caracteriza como um projeto fatorial com 3 fatores controláveis e 2 níveis), mais pontos estrela  $2k$  ( $2 \times 3 = 6$  ensaios) e 5 pontos centrais, totalizando 19 ensaios (combinação dos níveis dos fatores). O projeto fatorial  $2^k$  permite o cálculo dos efeitos

principais e de interação, os pontos estrela possibilitam o cálculo dos efeitos quadráticos dos fatores e as repetições do ponto central permitem aumentar os graus de liberdade para o cálculo dos resíduos, do erro padrão e das estimativas por intervalo, propiciando a obtenção da significância dos fatores e aumentando a precisão da variância experimental. A TABELA 3 apresenta os níveis dos fatores controláveis em valores codificados e reais.

TABELA 3 - FATORES CONTROLÁVEIS E SEUS NÍVEIS CODIFICADOS E REAIS NO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL

Fatores controláveis	Unidades	Níveis				
		- 1,68	- 1	0	+ 1	+ 1,68
Concentração de cloreto de sódio	% (p/v)	9,6	13,0	18,0	23,0	26,4
Valor de pH inicial	-	6,69	7,20	7,95	8,70	9,21
Temperatura	°C	24,9	30,0	37,5	45,0	50,1

FONTE: O autor (2016).

Os cultivos foram inoculados com uma suspensão de células recém-preparada (seção 4.4), iniciaram com a concentração celular de  $0,33 \text{ g.L}^{-1}$  e foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de meio basal líquido com concentrações de cloreto de sódio, valores de pH inicial e nas condições de temperaturas apresentadas na TABELA 3. As combinações dos níveis dos fatores controláveis são mostradas na TABELA 4. Os cultivos foram mantidos em incubadora refrigerada de movimento orbital Novatécnica®, modelo NT 715, a 150 rpm durante 120 horas.

As variáveis resposta concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e concentração de carotenoides ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) foram medidas em cada condição de cultivo, conforme descrição nas seções 4.8 a 4.11. Os dois modelos que descrevem a relação entre as respostas concentração celular e concentração de carotenoides e os fatores controláveis foram determinados por meio de uma equação polinomial de segunda ordem **(1)**:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{ij=1}^n \beta_{ij} X_i X_j + e \quad (1)$$

onde Y é a resposta (concentração celular ou de carotenoides);  $\beta_0$  é uma constante;  $\beta_i$ , coeficientes lineares;  $\beta_{ii}$ , coeficientes quadráticos;  $\beta_{ij}$ , coeficientes de interação; X, valores reais das variáveis testadas; e, erro de ajustamento observado na resposta y (diferença entre o valor da resposta observado experimentalmente e o valor correspondente estimado por meio do modelo ajustado).

TABELA 4 - COMBINAÇÕES DOS NÍVEIS DOS FATORES CONTROLÁVEIS CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO, VAOR DE pH INICIAL E TEMPERATURA NOS 19 ENSAIOS DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL

Ensaio	Fatores controláveis		
	NaCl (% p/v)	pH inicial	Temperatura (°C)
1	18,0 (0)	9,20 (+1,68)	37,5 (0)
2	23,0 (+1)	8,70 (+1)	45,0 (+1)
3	9,59 (-1,68)	7,95 (0)	37,5 (0)
4	18,0 (0)	7,95 (0)	37,5 (0)
5	18,0 (0)	6,68 (-1,68)	37,5 (0)
6	13,0 (-1)	7,20 (-1)	30,0 (-1)
7	23,0 (+1)	8,70 (+1)	30,0 (-1)
8	18,0 (0)	7,95 (0)	37,5 (0)
9	13,0 (-1)	7,20 (-1)	45,0 (+1)
10	18,0 (0)	7,95 (0)	24,9 (-1,68)
11	18,0 (0)	7,95 (0)	37,5 (0)
12	13,0 (-1)	8,70 (+1)	45,0 (+1)
13	13,0 (-1)	8,70 (+1)	30,0 (-1)
14	18,0 (0)	7,95 (0)	37,5 (0)
15	23,0 (+1)	7,20 (-1)	45,0 (+1)
16	18,0 (0)	7,95 (0)	50,1 (+1,68)
17	18,0 (0)	7,95 (0)	37,5 (0)
18	26,4 (+1,68)	7,95 (0)	37,5 (0)
19	23,0 (+1)	7,20 (-1)	30,0 (-1)

FONTE: O autor (2016).

NOTA: Os valores entre parênteses indicam os níveis codificados dos fatores controláveis.

Os efeitos lineares, quadráticos e de interação foram avaliados. Os gráficos tridimensionais de superfície de resposta e os gráficos de contorno foram elaborados para ilustrar os efeitos principais e de interação das variáveis nas concentrações de células e de carotenoides.

Os níveis ótimos dos fatores controláveis concentração de cloreto de sódio, pH e temperatura preditos pelos modelos para promover o aumento das concentrações de células e carotenoides foram confirmados por cultivos independentes e em

triplicata. Os cultivos iniciaram com a concentração celular de  $0,33 \text{ g.L}^{-1}$  (seção 4.4), foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de meio basal líquido com concentrações de cloreto de sódio, valores de pH inicial e nas condições de temperaturas previstas pelos modelos. Os cultivos foram mantidos em incubadora refrigerada de movimento orbital Novatécnica®, modelo NT 715, a 150 rpm durante 120 horas. As concentrações de células e de carotenoides obtidas nos cultivos otimizados para a produção de células e de carotenoides foram determinadas conforme descrição nas seções 4.8 a 4.11.

#### 4.13 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs)

As células intactas recém-crescidas (frescas) e as células secas da *Archaea Halorubrum saccharovororum* (ATCC® 29252™) obtidas de cultivos realizados nas condições ótimas previstas para a produção de carotenoides foram utilizadas para o preparo de um extrato aquoso  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  utilizando água ultrapura. As células com maior conteúdo de carotenoides, obtidas nas condições otimizadas para a produção de carotenoides, foram selecionadas para a síntese de AgNPs devido à capacidade antioxidante e, portanto, redutora dos carotenoides que poderiam atuar na redução dos íons metálicos e consequente formação de AgNPs. (KUMAR et al., 2016; NARAYANAN e SAKTHIVEL, 2010).

Para a síntese de AgNPs, 2,5 mL do extrato aquoso de células frescas ou secas foram transferidos para um tubo de ensaio e foram adicionados 2,5 mL de uma solução de nitrato de prata (Synth)  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$ , recém-preparada e protegida da luz. Desta forma, a concentração final de nitrato de prata na mistura reacional foi de  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Os controles negativos foram preparados misturando-se 2,5 mL do extrato aquoso de células frescas ou secas com 2,5 mL de água ultrapura em tubo de ensaio bem como 2,5 mL de solução de nitrato de prata  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  e 2,5 mL de água ultrapura. Os tubos foram mantidos em banho-maria nas temperaturas de  $37^\circ\text{C}$  ou  $75^\circ\text{C}$  durante 120 minutos e a possível formação das AgNPs foi monitorada por meio de análises espectrofotométricas.

O extrato aquoso das células da *Archaea Halorubrum saccharovororum* (ATCC® 29252™) foi avaliado quanto à composição molecular e as AgNPs produzidas foram caracterizadas quanto ao tamanho, forma, polidispersidade, carga superficial e condutividade elétrica.

#### 4.14 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs)

A caracterização das AgNPs foi realizada no Laboratório de Nanobiotecnologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia de Brasília (Distrito Federal). Para o monitoramento da síntese de AgNPs, foi realizada a leitura da absorbância das misturas reacionais, em intervalos de 30 minutos, em espectrofotômetro UV-Vis Quimis (SP-2000), modelo Q898U, no comprimento de onda de 425 nm, utilizando cubetas de plástico com caminho óptico de 1 cm.

A caracterização das AgNPs em relação ao diâmetro hidrodinâmico, ao potencial Zeta de superfície, ao índice de polidispersividade (Pdl) e à condutividade elétrica foi realizada nas amostras pela técnica do espalhamento de luz dinâmico e potencial Zeta em equipamento ZetaSizer Nano ZS (Malvern), utilizando laser He-Ne (4 mW) a 633 nm operando em um ângulo de 173°. Os dados foram analisados com auxílio do software ZetaSizer versão 6.12.

A forma e a altura (diâmetro seco) das AgNPs sintetizadas foram determinadas por microscopia de força atômica utilizando um instrumento SPM-9600 (Shimadzu) equipado com um escâner de 125 µm de percurso máximo nos eixos X e Y, em modo dinâmico, utilizando um cantilever retangular integrado com ponteiros cônicos de silício e apresentando constante de mola de 10 a 130 N.m<sup>-1</sup> (nominalmente 42 N.m<sup>-1</sup>) e frequência de ressonância de 204 a 497 kHz (nominalmente ~260 kHz). Um µL de cada amostra diluída 1:10 foi depositado sobre a superfície de mica muscovita recém-clivada e, após a secagem, as amostras foram montadas em um suporte de metal (porta-amostra) e acopladas à base do instrumento. As varreduras foram realizadas em áreas de 10 µm x 10 µm com frequência de 1 Hz e as imagens foram obtidas com resolução de 512 x 512 linhas, sendo processadas para a correção de plano pelo software *off-line* que acompanha o microscópio.

A avaliação do perfil dos possíveis componentes moleculares envolvidos na síntese das AgNPs foi realizada por espectrometria de massa com ionização/dessorção à laser assistida por matriz e analisador de tempo de voo (MALDI-TOF). Um µL de cada amostra foi aplicado na placa-alvo do equipamento e, após a secagem a temperatura ambiente, foi depositado 1 µL de solução saturada da matriz de ácido α-ciano hidroxicinâmico (CHCA, do inglês *α-cyano-4-hydroxycinnamic acid*, Bruker Daltonics) na concentração 10 mg.mL<sup>-1</sup>. As amostras cristalizadas foram analisadas no espectrômetro de massa MALDI-TOF modelo AutoFlex Speed (Bruker

Daltonics). A aquisição dos espectros foi realizada automaticamente com 10.000 disparos de laser a 200 Hz e a amplitude de massa detectada foi de 600 a 3.000 Da.

#### 4.15 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram calculados a média e o desvio padrão das concentrações de células e de carotenoides totais obtidas nos cultivos da *Archaea* halofílica *Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) em diferentes condições ambientais e dos valores de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade, potencial Zeta, condutividade elétrica e diâmetro seco das AgNPs sintetizadas a partir dos extratos de células frescas e secas da *Archaea*. A comparação das médias foi realizada pelo teste *t* de Student, adotando-se um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) e utilizando-se o programa Statistica 8.0.

A análise estatística dos resultados referentes ao experimento de otimização por meio da metodologia de superfície de resposta foi realizada empregando o programa estatístico Minitab® 16. As análises de normalidade foram realizadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e as análises de homogeneidade de variâncias, pelo teste de Levene. Foram realizadas as análises de variância (ANOVA) para os modelos de regressão e para os fatores controláveis testados. A significância estatística dos modelos de regressão e dos coeficientes foram avaliados pelo teste *F* (Fischer) e o teste *t* de Student, respectivamente, adotando-se um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). A adequação do modelo de regressão foi verificada pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia previamente estabelecida para a análise da produção de carotenoides pela *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) consistia no uso de metanol para a extração dos carotenoides. (CALEGARI-SANTOS, 2012). No entanto, a presença de cloreto de sódio residual no extrato, proveniente do meio de cultivo, causava o aparecimento de um precipitado branco que interferia na leitura da absorbância para a quantificação dos carotenoides. Com isso, houve a necessidade de estabelecer uma nova metodologia para a extração dos carotenoides que eliminasse a presença e, consequentemente, a interferência do cloreto de sódio.

Com o objetivo de remover o sal presente no extrato metanólico, a extração dos carotenoides das células secas da *Archaea* foi realizada com metanol seguida por partição líquido-líquido com hexano. Desta forma, o cloreto de sódio permaneceu na fase metanólica e o extrato em hexano não apresentou o precipitado branco e nenhuma interferência para a quantificação dos carotenoides.

No intuito de facilitar a extração dos carotenoides, também foi empregada a extração com água seguida por metanol e partição líquido-líquido com hexano. A água foi utilizada com o objetivo de promover a lise das células da *Archaea*, facilitando a remoção dos carotenoides.

Desta forma, foi estabelecida a metodologia para a extração dos carotenoides conforme descrição na seção 4.10 (Material e métodos). O extrato seco foi utilizado para a quantificação de carotenoides por espectrofotometria de absorção nas regiões do ultravioleta e visível.

### 5.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS NO CRESCIMENTO E NA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES PELA *ARCHAEA Halorubrum saccharovorum*

A *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) foi cultivada em diferentes concentrações de cloreto de sódio, valores de pH inicial e temperaturas para estabelecer os valores mínimos e máximos nos quais ocorrem o crescimento e a produção de carotenoides. A velocidade de agitação do cultivo, que está diretamente relacionada à sua aeração, bem como o tempo de cultivo foram condições que não demonstraram efeito significativo no crescimento e na produção de carotenoides pela



*Archaea Halorubrum saccharovorum* (CALEGARI-SANTOS, 2012) e, portanto, não foram avaliadas neste trabalho.

Em todos os cultivos realizados foram fixadas as relações entre o volume de meio e o volume de frasco bem como a velocidade de agitação.

Para ilustrar as características de turbidez e coloração dos cultivos, que sugerem, respectivamente, suas concentrações celulares e de carotenoides, a FIGURA 9 mostra os cultivos realizados com concentrações iniciais de cloreto de sódio entre 5% e 25% (p/v).

FIGURA 9 - CULTIVOS DA ARCHAEA *Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) NAS CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO DE 5%, 10%, 15%, 20% E 25% (p/v)



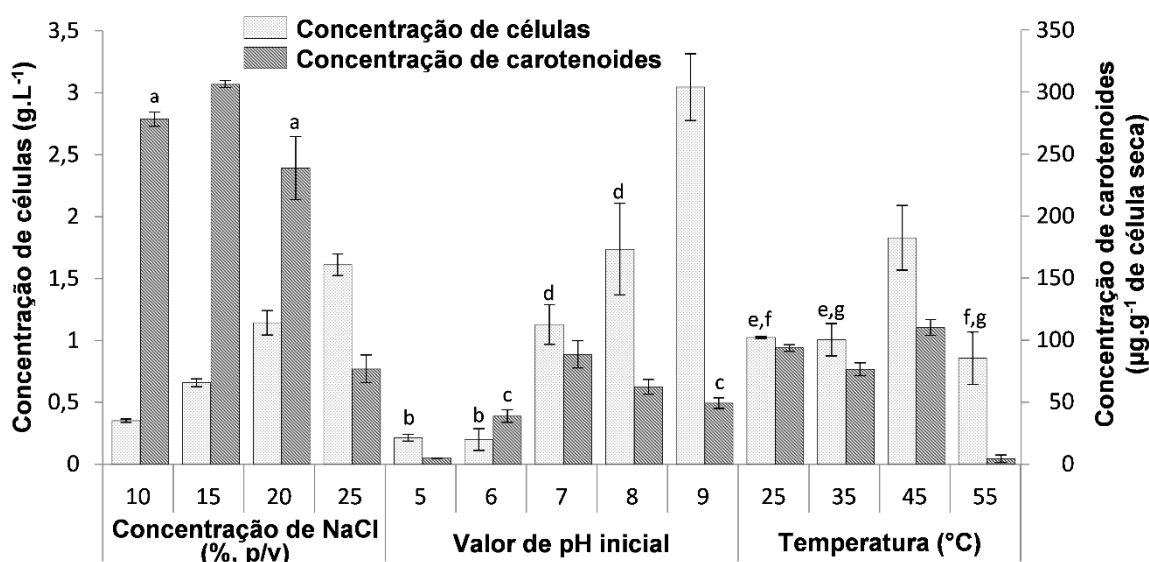
FONTE: O autor (2016).

As concentrações celulares e de carotenoides nos cultivos contendo concentrações de cloreto de sódio entre 10% e 25% (p/v), valores de pH inicial entre 5 e 9 e temperaturas entre 25 °C e 55 °C estão demonstradas na FIGURA 10.

A *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) cresceu entre 10 e 25% (p/v) de cloreto de sódio, dentro da faixa de 9 a 30% (p/v) de cloreto de sódio descrita por Oren (2006). As maiores concentrações celulares de  $1,61 \pm 0,09 \text{ g.L}^{-1}$  e  $1,14 \pm 0,10 \text{ g.L}^{-1}$  foram verificadas nos cultivos com concentrações de cloreto de sódio de 25% e 20% (p/v), respectivamente. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre todas as concentrações celulares medidas. O aumento da concentração inicial de cloreto de sódio nos cultivos promoveu maiores concentrações celulares. Em contraste, a concentração de carotenoides diminuiu com o aumento da

concentração inicial de cloreto de sódio de 15% para 25% (p/v). Não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) somente entre as concentrações de carotenoides obtidas a partir dos cultivos realizados com as concentrações de cloreto de sódio de 10 e 20%. A maior concentração de carotenoides de  $306,83 \pm 2,79 \mu\text{g.g}^{-1}$  de células secas foi verificada no cultivo contendo 15% de cloreto de sódio e a menor concentração de  $76,94 \pm 11,24 \mu\text{g.g}^{-1}$  de células secas foi observada no cultivo com concentração de cloreto de sódio de 25% (p/v). Tanto o crescimento quanto a produção de carotenoides não ocorreram nos cultivos contendo 5% (p/v) de cloreto de sódio provavelmente porque, em baixas concentrações de cloreto de sódio, os íons sódio estão diluídos e não contribuem para a estabilização da parede celular. Consequentemente, as regiões negativamente carregadas da parede celular das *Archaea* halofílicas tendem a se repelir, causando a lise celular (FENDRIHAN et al., 2006; MADIGAN et al., 2012a, 2012b).

FIGURA 10 - CONCENTRAÇÕES DE CÉLULAS E DE CAROTENOIDES OBTIDAS DOS CULTIVOS DA *ARCHAEA Halorubrum saccharovororum* (ATCC® 29252™) ENTRE 10% E 25% DE CLORETO DE SÓDIO, VALORES DE PH INICIAL ENTRE 5 E 9 E TEMPERATURAS ENTRE 25 °C E 55 °C



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Nos cultivos em diferentes concentrações de cloreto de sódio, o valor de pH inicial do meio de cultivo foi 7,6 e a temperatura de cultivo foi de 37 °C; nos cultivos em diferentes valores de pH inicial do meio de cultivo, a concentração de cloreto de sódio foi de 25% (p/v) e a temperatura de cultivo foi de 37 °C; e nos cultivos realizados em diferentes temperaturas, a concentração de cloreto de sódio do meio de cultivo foi de 25% (p/v) e o pH inicial do meio foi de 7,6. As barras mostram a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. As mesmas letras sobre as barras representam nenhuma diferença estatística (teste  $t$  de Student,  $p > 0,05$ ).

Nos cultivos com valores de pH inicial superiores a 7 foram obtidas as maiores concentrações celulares, ocorrendo o aumento destas concentrações à medida que o valor de pH aumentava de 7 para 9 (neutro ou alcalino). Não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) nas concentrações celulares obtidas dos cultivos realizados em pH 7 e 8. Os cultivos em valores de pH inicial ácido de 5 e 6 não apresentaram diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) em relação às concentrações celulares e forneceram, respectivamente, 14 e 15 vezes menos células quando comparados ao cultivo realizado em pH inicial alcalino de 9, o qual proporcionou a maior concentração celular de  $3,04 \pm 0,27 \text{ g.L}^{-1}$ . As maiores concentrações de carotenoides foram verificadas nos cultivos com valores de pH inicial próximos da neutralidade e tendendo a alcalinos (7 e 8), ocorrendo a maior concentração de  $88,68 \pm 11,03 \mu\text{g.g}^{-1}$  de células secas no cultivo realizado em pH 7. Não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) somente entre as concentrações de carotenoides obtidas a partir dos cultivos realizados em valores de pH inicial de 6 e 9. De acordo com Oren (2006), o pH neutro é o pH ótimo para o crescimento da *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) e, segundo Bowers e Wiegel (2011), em pH neutro ou próximo de neutro, as *Archaea* halofílicas mantêm o gradiente de pH e uma ótima força próton motiva.

Tomlinson e Hochstein (1976), assim como Robinson et al. (2005), demonstraram que a *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) cresce na faixa de temperatura de 30 °C a 56 °C e 23 °C a 55 °C, respectivamente. Um resultado semelhante foi obtido neste trabalho visto que a *Archaea* cresceu em temperaturas entre 25 °C e 55 °C. O cultivo realizado na temperatura de 45 °C forneceu a maior concentração celular de  $1,83 \pm 0,26 \text{ g.L}^{-1}$  quando comparado às outras temperaturas de cultivo que proveram aproximadamente o mesmo conteúdo de células ( $p > 0,05$ ). Entretanto, a produção de carotenoides ocorreu somente nas temperaturas entre 25 °C e 45 °C. A maior concentração de carotenoides de  $110,36 \pm 6,30 \mu\text{g.g}^{-1}$  de células secas foi obtida no cultivo desenvolvido na temperatura de 45 °C. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre todas as concentrações de carotenoides medidas. Em temperatura moderada, a membrana celular das *Archaea* halofílicas são menos permeáveis aos íons sódio quando comparadas a altas temperaturas (superiores ou iguais a 50 °C), favorecendo a manutenção de uma concentração milimolar de íons sódio dentro da célula e um equilíbrio aquoso positivo (BOWERS e WIEGEL, 2011).

Com base nestes resultados, foram definidas as faixas das condições (TABELA 3, seção 4.12) para a otimização da produção de células e carotenoides pela *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™). Além disso, as condições de cultivo para o desenvolvimento do inóculo foram modificadas para 20% (p/v) de cloreto de sódio, pH inicial de 7 e temperatura de 45 °C visto que nestas condições foram obtidas maiores concentrações de células e de carotenoides.

## 5.2 EFEITO DA PRESENÇA DE LUZ NO CRESCIMENTO E NA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES PELA *ARCHAEA Halorubrum saccharovorum*

A *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) foi cultivada na presença e na ausência de luz em meios de cultivo com 25% (p/v) de cloreto de sódio e valor de pH inicial de 7,6, na temperatura de 37 °C, agitação de 150 rpm, durante 120 horas, para verificar o efeito da luz no crescimento e na produção de carotenoides. A concentração celular nos cultivos realizados na presença e na ausência de luz não apresentaram diferença estatística ( $p > 0,05$ ) visto que na presença de luz foi obtida a concentração celular de  $1,68 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$  e, na ausência de luz,  $2,02 \pm 0,25 \text{ g.L}^{-1}$ . Entretanto, a concentração de carotenoides obtida no cultivo na presença de luz ( $173,62 \pm 9,74 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$  de células secas) foi cerca de 2 vezes maior que no cultivo na ausência de luz ( $83,88 \pm 15,91 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$  de células secas) e, portanto, houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as concentrações de carotenoides. A indução da produção de carotenoides já havia sido verificada durante o cultivo da *Archaea Halobacterium salinarum* JCM 10927 sob a incidência de luz (EL-SAYED et al., 2002) e corrobora a hipótese de que os carotenoides podem desempenhar a função de fotoproteção para os micro-organismos halofílicos do domínio *Archaea*.

## 5.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO CELULAR E DE CAROTENOIDES PELA *ARCHAEA Halorubrum saccharovorum*

A metodologia de superfície de resposta foi empregada para determinar os níveis ótimos dos fatores controláveis concentração de cloreto de sódio ( $X_1$ ), valor de pH inicial ( $X_2$ ) e temperatura ( $X_3$ ) para o crescimento e produção de carotenoides pela *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™). Estes fatores foram investigados nos intervalos operacionais apresentados na TABELA 3 (seção 4.12) e

determinados a partir dos resultados obtidos dos cultivos da *Archaea* em diferentes condições ambientais, considerando as condições nas quais ocorreram tanto o crescimento do micro-organismo como a produção de carotenoides.

A TABELA 5 apresenta as concentrações celulares e de carotenoides obtidas dos 19 ensaios resultantes da combinação dos três fatores controláveis testados.

TABELA 5 - NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS DOS FATORES CONTROLÁVEIS TESTADOS E CONCENTRAÇÕES DE CÉLULAS E DE CAROTENOIDES OBTIDAS EM CADA ENSAIO

Ensaio	Fatores controláveis			Respostas	
	NaCl (%, p/v)	pH inicial	Temperatura (°C)	Concentração celular (g.L <sup>-1</sup> )	Concentração de carotenoides (µg g <sup>-1</sup> de células secas)
1	18,0 (0)	9,21 (+1,68)	37,5 (0)	2,3289	195,045
2	23,0 (+1)	8,70 (+1)	45,0 (+1)	2,6370	127,301
3	9,6 (-1,68)	7,95 (0)	37,5 (0)	0,3912	426,891
4	18,0 (0)	7,95 (0)	37,5 (0)	1,5318	242,181
5	18,0 (0)	6,69 (-1,68)	37,5 (0)	0,7446	490,257
6	13,0 (-1)	7,20 (-1)	30,0 (-1)	0,6512	388,191
7	23,0 (+1)	8,70 (+1)	30,0 (-1)	1,4778	25,027
8	18,0 (0)	7,95 (0)	37,5 (0)	1,4679	235,371
9	13,0 (-1)	7,20 (-1)	45,0 (+1)	0,2885	436,879
10	18,0 (0)	7,95 (0)	24,9 (-1,68)	0,7768	145,295
11	18,0 (0)	7,95 (0)	37,5 (0)	1,5081	255,254
12	13,0 (-1)	8,70 (+1)	45,0 (+1)	0,6675	158,977
13	13,0 (-1)	8,70 (+1)	30,0 (-1)	0,8125	381,015
14	18,0 (0)	7,95 (0)	37,5 (0)	1,4976	254,703
15	23,0 (+1)	7,20 (-1)	45,0 (+1)	1,9646	150,032
16	18,0 (0)	7,95 (0)	50,1 (+1,68)	2,3108	223,467
17	18,0 (0)	7,95 (0)	37,5 (0)	1,3447	264,701
18	26,4 (+1,68)	7,95 (0)	37,5 (0)	1,7659	88,593
19	23,0 (+1)	7,20 (-1)	30,0 (-1)	0,9723	94,123

FONTE: O autor (2016).

NOTA: Os valores entre parênteses indicam os níveis codificados dos fatores controláveis.

As concentrações celulares e de carotenoides variaram, respectivamente, entre 0,29 e 2,64 g.L<sup>-1</sup> e entre 25,03 e 490,26 µg.g<sup>-1</sup> de células secas. As maiores concentrações celulares, acima de 2,3 g.L<sup>-1</sup>, foram obtidas nos ensaios 1 (concentração de NaCl de 18,0%, valor de pH inicial de 9,21 e temperatura de 37,5 °C), 2 (concentração de NaCl de 23,0%, valor de pH inicial de 8,70 e temperatura de 45,0 °C) e 16 (concentração de NaCl de 18,0%, valor de pH inicial de 7,95 e

temperatura de 50,1 °C). Já as maiores concentrações de carotenoides, superiores a 400  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de células secas, foram verificadas nos ensaios 3 (concentração de NaCl de 9,6%, valor de pH inicial de 7,95 e temperatura de 37,5 °C), 5 (concentração de NaCl de 18,0%, valor de pH inicial de 6,69 e temperatura de 37,5 °C) e 9 (concentração de NaCl de 13,0%, valor de pH inicial de 7,20 e temperatura de 45,0 °C). Estes resultados indicam que as condições que favorecem o crescimento e a produção de carotenoides não são as mesmas.

As maiores concentrações celulares obtidas não ultrapassaram a maior concentração celular (de 3,04  $\text{g.L}^{-1}$ ) obtida no cultivo realizado em pH 9 durante o estabelecimento dos valores mínimos e máximos nos quais ocorre o crescimento da *Archaea* (FIGURA 10). Já para a produção de carotenoides, a concentração de 490,26  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de células secas foi superior à maior concentração (310  $\mu\text{g}$  carotenoides totais. $\text{g}^{-1}$  de células secas) verificada nos cultivos para avaliação das faixas dos fatores controláveis nas quais ocorre a produção de carotenoides pela *Archaea* (FIGURA 10).

A partir dos resultados dos 19 ensaios, foram obtidos os modelos de regressão que estabelecem a relação entre os três fatores controláveis testados e as variáveis respostas. As TABELAS 6 e 7 mostram as análises de variância (ANOVA) para os modelos de regressão e para os fatores controláveis testados, respectivamente, considerando a resposta de concentração celular.

TABELA 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A RESPOSTA CONCENTRAÇÃO CELULAR

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	Valor p
Regressão	9	7,6435	0,8493	11,44	0,001
Resíduos	9	0,6682	0,0742		
Total	18	8,3117			

FONTE: O autor (2016).

Baseando-se na análise de variância para a concentração celular, como o valor  $p$  foi menor que  $\alpha$  (0,05) para os fatores controláveis concentração de cloreto de sódio ( $X_1$ ), valor de pH inicial ( $X_2$ ) e temperatura ( $X_3$ ), foi rejeitada a hipótese nula ( $H_0$ ) para estes fatores, concluindo-se, portanto, que eles apresentaram efeito significativo na produção de células pela *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™). Do mesmo modo, foram considerados significativos ( $p < 0,05$ ) o efeito quadrático da

concentração de cloreto de sódio ( $X_1^2$ ) e o efeito de interação entre a concentração de cloreto de sódio e a temperatura ( $X_1*X_3$ ). O valor de  $F$  de 11,44 com um valor de  $p < 0,05$  indicaram que o modelo foi significativo com alto nível de confiança. Além disso, foi obtido o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 91,96%, o que representa um bom ajuste do modelo para os resultados experimentais.

TABELA 7 - ESTIMATIVA DOS COEFICIENTES DO MODELO POR ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A RESPOSTA CONCENTRAÇÃO CELULAR

Termos do modelo	Coeficiente	Erro Padrão	$t$	valor $p$
Constante	1,478	0,122	12,141	0,000
$X_1^a$	0,508	0,074	6,896	0,000
$X_2^b$	0,321	0,074	4,352	0,002
$X_3^c$	0,309	0,074	4,195	0,002
$X_1^2$	-0,180	0,074	-2,447	0,037
$X_2^2$	-0,018	0,074	-0,251	0,808
$X_3^2$	-0,016	0,074	-0,217	0,833
$X_1*X_2$	0,080	0,096	0,827	0,429
$X_1*X_3$	0,332	0,096	3,450	0,007
$X_2*X_3$	0,048	0,096	0,499	0,630

FONTE: O autor (2016).

NOTA: <sup>a</sup> $X_1$ : concentração de cloreto de sódio, <sup>b</sup> $X_2$ : valor de pH inicial, <sup>c</sup> $X_3$ : temperatura.

Em relação à concentração de carotenoides, as TABELAS 8 e 9 mostram as análises de variância (ANOVA) para os modelos de regressão e para os fatores controláveis testados, respectivamente.

TABELA 8 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A RESPOSTA CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor $F$	Valor $p$
Regressão	9	280539	31171	10.12	0,001
Resíduos	9	27722	3080		
Total	18	308261			

FONTE: O autor (2016).

TABELA 9 - ESTIMATIVA DOS COEFICIENTES DO MODELO POR ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A RESPOSTA CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES

Termos do modelo	Coeficiente	Erro Padrão	<i>t</i>	valor <i>p</i>
Constante	252,071	24,790	10,168	0,000
$X_1^a$	-112,583	15,020	-7,496	0,000
$X_2^b$	-63,953	15,020	-4,258	0,002
$X_3^c$	8,516	15,020	0,567	0,585
$X_1^2$	-6,390	15,020	-0,425	0,681
$X_2^2$	23,629	15,020	1,573	0,150
$X_3^2$	-32,327	15,020	-2,152	0,060
$X_1 * X_2$	24,156	19,620	1,231	0,249
$X_1 * X_3$	41,442	19,620	2,112	0,064
$X_2 * X_3$	-28,045	19,620	-1,429	0,187

FONTE: O autor (2016).

NOTA: <sup>a</sup> $X_1$ : concentração de cloreto de sódio, <sup>b</sup> $X_2$ : valor de pH inicial, <sup>c</sup> $X_3$ : temperatura.

A concentração de cloreto de sódio ( $X_1$ ) e o valor de pH inicial ( $X_2$ ) exibiram efeito significativo ( $p < 0,05$ ) na produção de carotenoides pela *Archaea Halorubrum saccharovororum* (ATCC® 29252™). O modelo também foi significativo em um alto intervalo de confiança visto que o valor *F* do modelo foi 10,12 com valor  $p < 0,05$ . Além disso, o modelo mostrou um bom ajuste aos dados experimentais devido ao valor de 91,01% para o coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

Para determinar a relação entre os fatores controláveis testados e as respostas, a análise de regressão dos dados experimentais foi realizada ajustando a um modelo matemático quadrático. As equações de regressão **(2)** e **(3)** estabeleceram a relação empírica para as concentrações de células e de carotenoides, respectivamente, e seus termos estão expressos em valores reais.

$$Y_1 = 1,455 - 0,140X_1 + 0,247X_2 - 0,165X_3 - 0,007X_1^2 + 0,009X_1X_3 \quad (2)$$

$$Y_2 = 3238,060 - 105,968X_1 - 682,179X_2 \quad (3)$$

onde,  $Y_1$  e  $Y_2$  são as respostas de concentrações de células e de carotenoides, respectivamente;  $X_1$  é a concentração de cloreto de sódio;  $X_2$  é o valor de pH inicial;  $X_3$  é a temperatura.



As equações de regressão foram maximizadas para determinar os valores ótimos dos fatores controláveis para as respostas concentração celular e de carotenoides. De acordo com os modelos, a maior concentração celular de 4,08 g.L<sup>-1</sup> seria obtida no cultivo com concentração inicial de 26,4% (p/v) de cloreto de sódio, pH inicial de 9,2 e a temperatura de 50,1 °C. Por sua vez, a maior concentração de carotenoides de 667,570 µg.g<sup>-1</sup> de células secas ocorreria no cultivo com 9,6% (p/v) de cloreto de sódio, pH 6,7 e temperatura de 35,8 °C. Desta forma, as condições de concentração de cloreto de sódio, valor de pH inicial e temperatura do cultivo que favorecem a produção de células e de carotenoides pela *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) não são as mesmas e sequer são semelhantes.

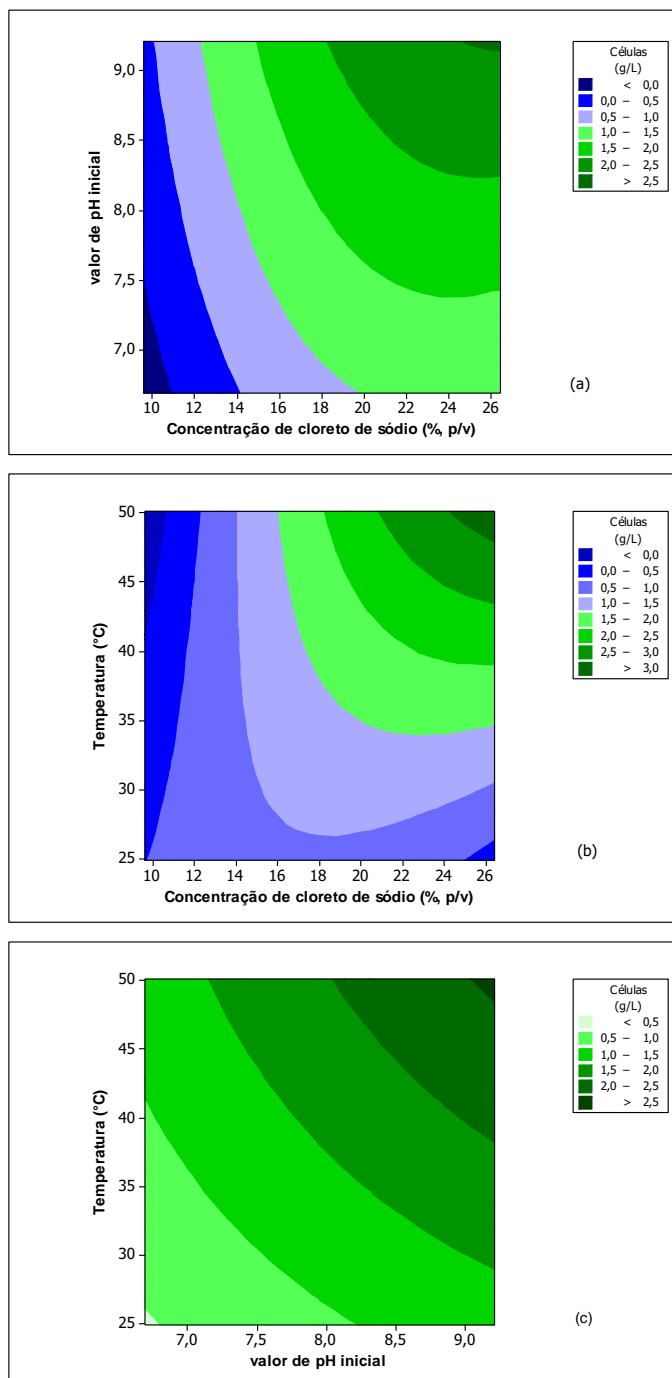
Ao analisar as curvas de contorno e as superfícies de resposta geradas pelos modelos, foi possível visualizar a mudança nas concentrações de células e de carotenoides na medida em que se alteravam os valores dos fatores controláveis.

As curvas de contorno (FIGURA 11) e superfície de resposta (FIGURA 12) para a concentração celular evidenciam que as maiores concentrações são obtidas à medida que os fatores controláveis de concentração de cloreto de sódio ( $X_1$ ), pH ( $X_2$ ) e temperatura ( $X_3$ ) aumentam.

O acréscimo na concentração celular com o aumento da concentração de cloreto de sódio no meio de cultivo também foi verificado para outras *Archaea* halofílicas. A *Archaea Haloferax mediterranei* ATCC® 33500™ quando crescida no intervalo de 10% e 35% (p/v) de sais totais, equivalente a 7,6% e 27% (p/v) de cloreto de sódio, apresentou crescimento ótimo em 20% (p/v) de sais totais (15,6% (p/v) de cloreto de sódio). (RODRIGUEZ-VALERA, RUIZ-BERRAQUERO e RAMOS-CORMENZANA, 1980). Segundo Kushwaha et al. (1982), o crescimento da mesma *Archaea* foi semelhante, entre 0,98 e 1,18 g proteína.L<sup>-1</sup>, nas concentrações de cloreto de sódio de 15% a 25% (p/v), com diminuição para 0,63 g proteína.L<sup>-1</sup> no cultivo contendo 35% (p/v) de cloreto de sódio. Resultado semelhante foi obtido com o cultivo da *Archaea Halobacterium salinarum* ATCC® 33170™, a qual apresentou crescimento similar (cerca de 0,6 g proteína.L<sup>-1</sup>) nas concentrações de cloreto de sódio entre 20% e 35% (p/v) de sais totais. O favorecimento da produção de células em maiores concentrações de cloreto de sódio (entre 15% e 25%, p/v) foi verificado também durante o cultivo da *Archaea Haloferax alexandrinus* JCM 10717, a qual evidenciou máximo crescimento em meio contendo 25% (p/v) de cloreto de sódio (ASKER e

OHTA, 1999), e das *Archaea Halorubrum* SP-2 e SP-4, que apresentaram crescimento ótimo em concentração de sais de 25% (p/v). (SUI, LIU e DENG, 2014).

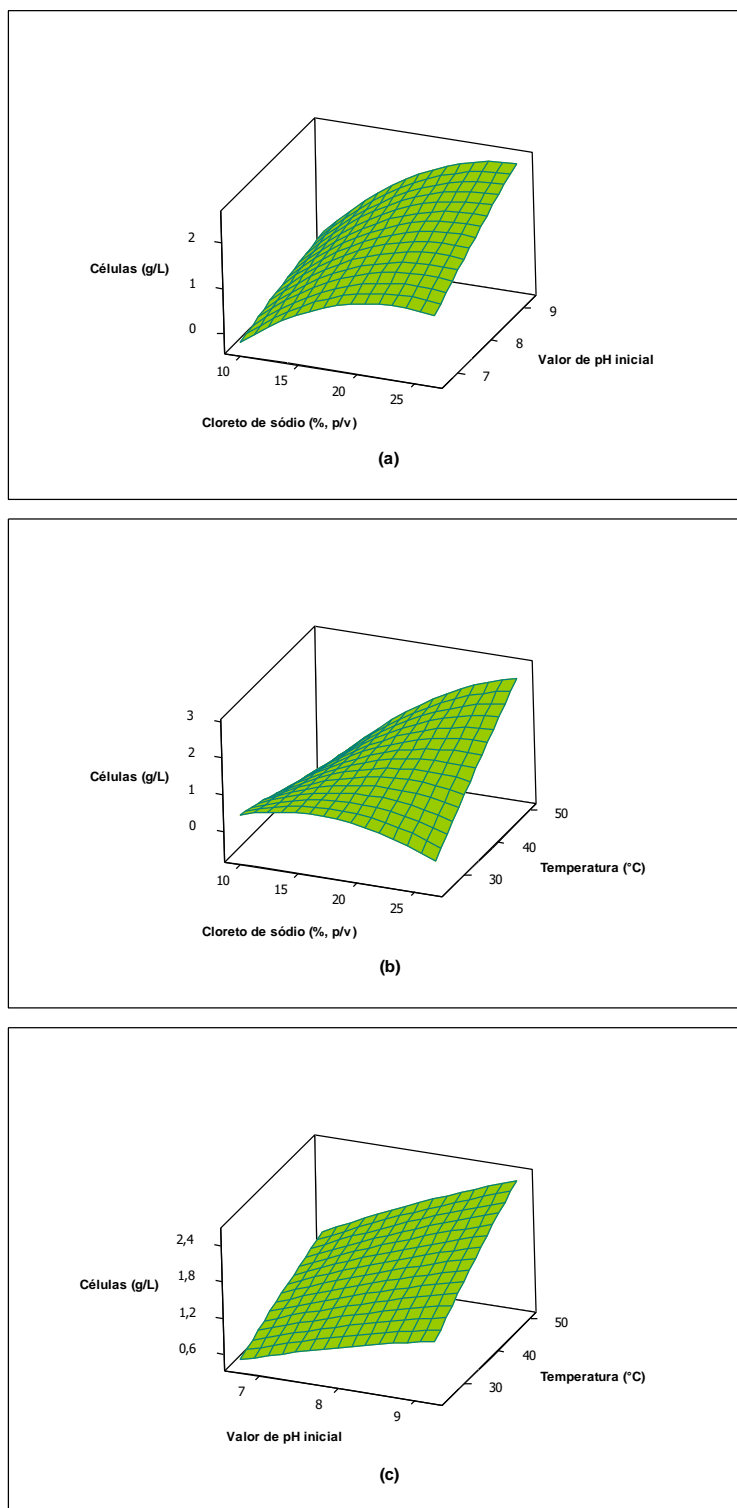
FIGURA 11 - CURVAS DE CONTOURNO PARA A CONCENTRAÇÃO CELULAR EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO E DO VALOR DE pH INICIAL (a), DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO E DA TEMPERATURA (b) E DO VALOR DE pH INICIAL E DA TEMPERATURA (c)



FONTE: O autor (2016).

NOTA: O valor do terceiro fator controlável, não mostrado na curva de contorno, foi mantido em seu ponto central, ou seja, temperatura de 37,5 °C (a), valor de pH inicial de 7,95 (b) e concentração de cloreto de sódio de 18% (p/v) (c).

FIGURA 12 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA PARA A CONCENTRAÇÃO CELULAR EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO E DO VALOR DE pH INICIAL (a), DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO E DA TEMPERATURA (b) E DO VALOR DE pH INICIAL E DA TEMPERATURA (c)

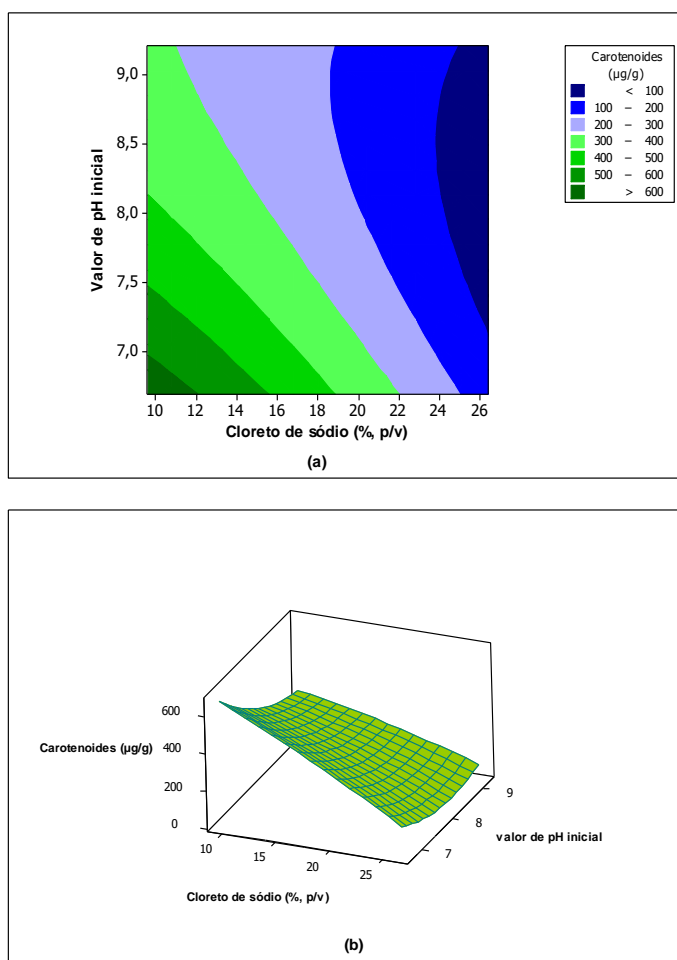


FONTE: O autor (2016).

NOTA: O valor do terceiro fator controlável, não mostrado na superfície de resposta, foi mantido em seu ponto central, ou seja, temperatura de 37,5 °C (a), valor de pH inicial de 7,95 (b) e concentração de cloreto de sódio de 18% (p/v) (c).

A curva de contorno e superfície de resposta (FIGURA 13) para a concentração de carotenoides em função dos fatores controláveis significativos (concentração de cloreto de sódio e valor de pH inicial) demonstraram que a produção de carotenoides pela *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) aumenta com a diminuição da concentração de cloreto de sódio e do valor de pH inicial do cultivo.

FIGURA 13 - CURVA DE CONTORNO (a) E SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (b) PARA A CONCENTRAÇÃO DE CAROTENOIDES EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO E DO VALOR DE pH INICIAL DO CULTIVO



FONTE: O autor (2016).

NOTA: O valor do terceiro fator controlável, não mostrado na curva de contorno e na superfície de resposta, foi mantido em seu ponto central, ou seja, temperatura de 37,5 °C.

O estímulo na produção de carotenoides devido à diminuição da concentração de cloreto de sódio no meio de cultivo foi observado em diferentes *Archaea* halofílicas. *Haloferax mediterranei* ATCC® 33500™ produziu 20 vezes mais carotenoides em meio contendo 15% (p/v) de sais totais do que em meio com 25% (p/v) de sais totais.

(RODRIGUEZ-VALERA, RUIZ-BERRAQUERO e RAMOS-CORMENZANA, 1980). Este resultado foi corroborado por Kushwaha et al. (1982) que cultivaram a mesma *Archaea* em meio com concentrações semelhantes de sais totais. A quantificação do conteúdo do carotenoide bacteriorrubrina revelou a produção de 420  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de proteína celular no cultivo contendo 15% (p/v) de sais totais. Por sua vez, D'Souza, Alterkar e D'Souza (1997) e Fang et al. (2010) demonstraram que a *Archaea Haloferax mediterranei* ATCC® 33500™ produziu mais que o dobro de carotenoides em cultivos contendo 10% e 5% (p/v) de cloreto de sódio, do que em cultivos com 20% (p/v) de cloreto de sódio.

*Haloferax volcanii* DSM 5716, cultivada em meios com 12,5% e 20,6% (p/v) de cloreto de sódio, produziu 1,6 a 1,7 mais carotenoides no meio com menor conteúdo do sal. (BIDLE et al., 2007). Ainda, *Halobacterium* SP-2 e *Halorubrum* SP-4 apresentaram a maior concentração de carotenoides em meio com concentração de sais de 15% (p/v) quando comparado aos meios com concentração de sais de até 30% (p/v). (SUI, LIU e DENG, 2014).

Entretanto, o cultivo da *Archaea Halobacterium salinarum* ATCC® 33170™ por Kushwaha et al. (1982) nas mesmas condições nas quais foi cultivada a *Archaea Haloferax mediterranei* ATCC® 33500™ resultou na ausência de produção de carotenoides na concentração de sais totais de 15% (p/v) e produção de mais de 1400  $\mu\text{g}$  bacteriorrubrinase  $\text{g}^{-1}$  de proteína celular nos cultivos contendo 20%, 25% e 35% (p/v) de sais totais. O micro-organismo *Haloferax alexandrinus* JCM 10717<sup>T</sup> também produziu maiores concentrações de carotenoides quando cultivado em meios com concentrações mais elevadas de cloreto de sódio (25%, p/v). (ASKER e OHTA, 1999).

Com isso, constata-se que a concentração de cloreto de sódio influencia a produção de carotenoides pelas *Archaea* halofílicas já estudadas. Porém, a concentração ótima de cloreto de sódio na qual é observada a maior produção de carotenoides está relacionada também com o requerimento de sal pelo micro-organismo.

Para a validação dos modelos gerados pela metodologia de superfície de resposta, foram realizados cultivos utilizando os valores ótimos dos fatores controláveis informados pelo programa Minitab® 16. Quando a *Archaea* halofílica *Halorubrum saccharovororum* (ATCC® 29252™) foi cultivada em meio contendo concentração inicial de cloreto de sódio de 26,5% (p/v) com valor de pH inicial de 9,2

e a temperatura de 50,1 °C, a concentração celular obtida, de  $4,42 \pm 0,56 \text{ g.L}^{-1}$ , foi similar à concentração predita pelo modelo de  $4,08 \text{ g.L}^{-1}$ . O mesmo foi verificado para a produção de carotenoides: o cultivo da *Archaea* halofílica em meio com 9,6% (p/v) de cloreto de sódio em valor de pH inicial de 6,7 e temperatura de 35,8 °C forneceu a concentração de carotenoides totais de  $670,27 \pm 19,62 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$  de células secas, próxima daquela prevista pelo modelo ( $667,57 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$  de células secas). Estes valores para as concentrações de carotenoides ainda não haviam sido alcançados neste trabalho durante os cultivos da *Archaea Halorubrum saccharovororum* (ATCC® 29252™). A maior concentração de carotenoides totais obtida até então havia sido de  $490,26 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$  de células secas (TABELA 5).

Com a estratégia de otimização, as concentrações de células e de carotenoides aumentaram 2,7 e 8,7 vezes, respectivamente, quando comparadas às concentrações obtidas nas condições utilizadas para o crescimento do micro-organismo (meio líquido basal contendo 25% (p/v) de cloreto de sódio, valor de pH inicial de 7,6 e temperatura de 37 °C). Nestas condições, as concentrações de células e de carotenoides foram de apenas  $1,61 \text{ g.L}^{-1}$  e  $76,94 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$  de células secas, respectivamente.

O presente estudo foi o primeiro relato sobre a utilização da *Archaea* halofílica *Halorubrum saccharovororum* (ATCC® 29252™) para a otimização da produção de carotenoides. Outras estratégias de otimização foram utilizadas para aumentar a produção de células e de carotenoides por outras *Archaea* halofílicas, como *Haloferax alexandrinus* e *Halorubrum* sp. TBZ126. (ASKER e OHTA, 1999; HAMIDI et al., 2014). Empregando a estratégia “uma variável por vez”, a *Archaea Haloferax alexandrinus* produziu a maior concentração celular e  $2,06 \text{ mg carotenoides totais.g}^{-1}$  de células secas na condição otimizada (25%, p/v, de cloreto de sódio, pH 7,2, temperatura de 37 °C, sob agitação por 6 dias). (ASKER e OHTA, 1999). Alternativamente, a metodologia de superfície de resposta foi empregada para otimizar o crescimento e a produção de carotenoides pela *Archaea Halorubrum* sp. TBZ126. A *Archaea* produziu  $0,90 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$  e  $11,71 \pm 0,01 \text{ mg carotenoides.L}^{-1}$  nas condições otimizadas para a produção de células e de carotenoides, isto é, 18,33% e 20,55% (p/v) de cloreto de sódio, valor de pH de 7,51 e 7,94, temperatura de 31 °C e 32 °C, respectivamente, por 9 dias. (HAMIDI et al., 2014).

Os valores ótimos dos fatores controláveis (concentração de cloreto de sódio, valor de pH inicial e temperatura) nos quais ocorreram as maiores produções de células e de carotenoides pelas *Archaea Haloferax alexandrinus* e *Halorubrum* sp.

TBZ126 foram as mesmas ou similares, respectivamente. Por outro lado, as condições ótimas fornecidas para o crescimento e produção de carotenoides foram diferentes para a *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) utilizada neste trabalho.

Variações nas produções de células e de carotenoides podem ocorrer devido à capacidade de produção diferente de cada micro-organismo. Um possível aumento da produção de carotenoides por *Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) necessita estratégias de investigação adicionais, como o uso de outras condições de cultivo, tal como suplementação de nutrientes ou de meios complexos de baixo custo.

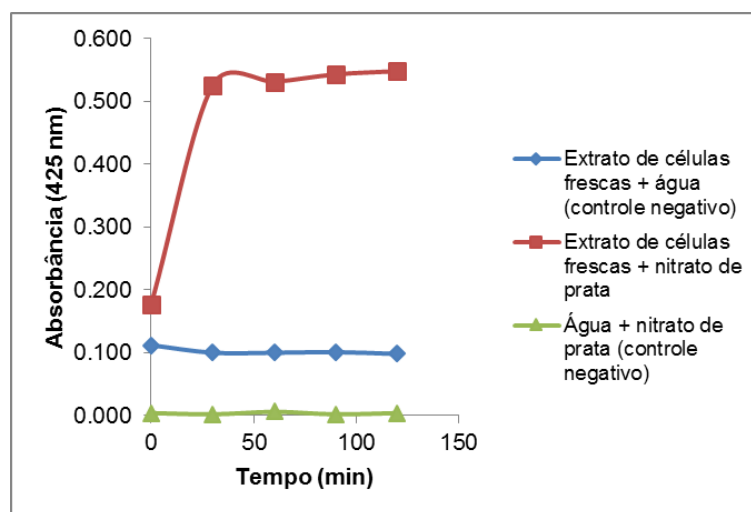
Os carotenoides de *Archaea* halofílicas apresentam capacidade antioxidante, podendo favorecer a redução de íons prata e, consequentemente, a formação de nanopartículas de prata. Por isso, células da *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) obtidas nas condições otimizadas para a produção de carotenoides foram utilizadas para a síntese de nanopartículas de prata.

#### 5.4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNPs)

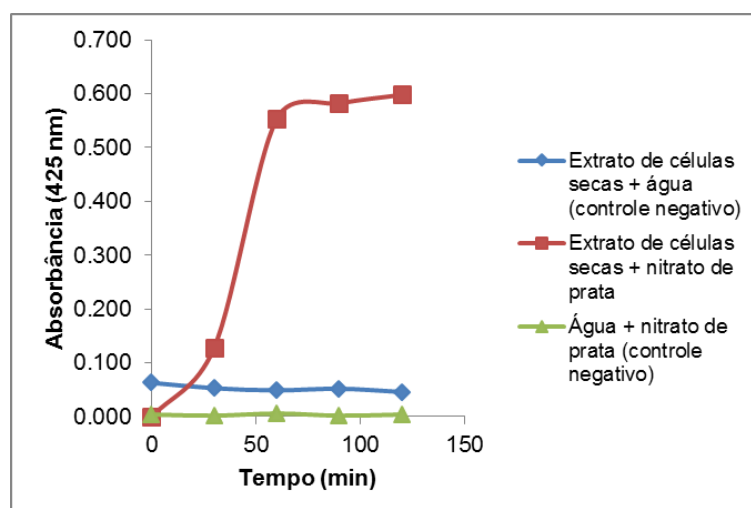
A confirmação preliminar da formação de nanopartículas metálicas é comumente realizada por espectroscopia na região do ultravioleta e visível. (BAKER et al., 2013). As AgNPs apresentam absorção característica em comprimento de onda entre cerca de 400 nm a 420 nm devido à ressonância plasmônica de superfície, atribuída à oscilação dos elétrons livres das nanopartículas metálicas. Este comprimento de onda de absorção depende do tamanho e da forma das AgNPs, bem como do meio circundante. (AMENDOLA, BAKR e STELLACCI, 2010; ARAGÃO et al., 2016; KALPANA e LEE, 2013). A formação das AgNPs também pode ser acompanhada visualmente pela mudança de coloração da mistura reacional visto que o comprimento de onda de absorção das nanopartículas se refere à região visível do espectro eletromagnético.

A síntese das AgNPs empregando os extratos de células frescas e secas da *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) foi monitorada pela verificação da absorbância das misturas reacionais a 425 nm em função do tempo de reação. A FIGURA 14 apresenta a cinética de formação das AgNPs sintetizadas na temperatura de 75 °C. Os resultados obtidos na temperatura de 37 °C não demonstraram a síntese das AgNPs.

FIGURA 14 - CINÉTICA DE FORMAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS NA TEMPERATURA DE 75 °C EMPREGANDO AS CÉLULAS FRESCAS (a) E SECAS (b) DA *ARCHAEA Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™)



(a)



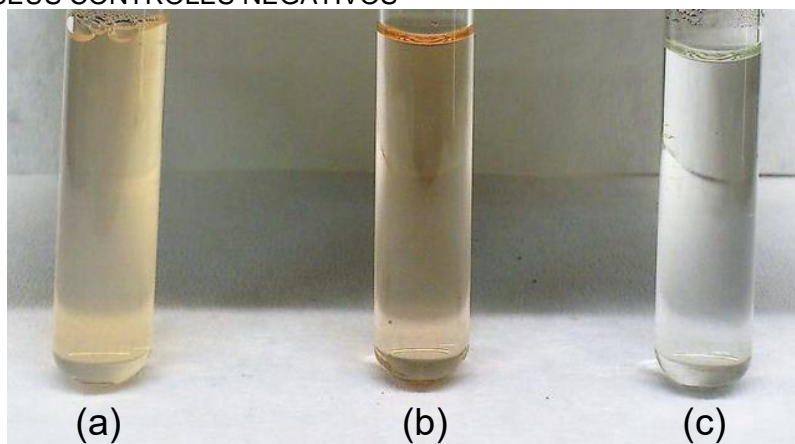
(b)

FONTE: O autor (2016).

O aumento da absorbância das misturas reacionais dos extratos das células frescas e secas na presença de nitrato de prata e a mudança de cor da mistura reacional (FIGURA 15) indicaram que ocorreu a formação de AgNPs. A síntese das AgNPs a partir do extrato de células frescas ocorreu em menor tempo de reação (30 minutos) quando comparado ao extrato de células secas (60 minutos). Não foi verificado aumento na absorbância das misturas reacionais referentes aos controles negativos.



FIGURA 15 - MISTURAS REACIONAIS CONTENDO AS NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS NA TEMPERATURA DE 75 °C A PARTIR DO EXTRATO DE CÉLULAS FRESCAS DA ARCHAEA *Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) E SEUS CONTROLES NEGATIVOS



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Os tubos (a), (b) e (c) referem-se às misturas reacionais do extrato de células frescas com a solução de nitrato de prata, do extrato de células frescas com água ultrapura (controle negativo) e da solução de nitrato de prata com água (controle negativo), respectivamente.

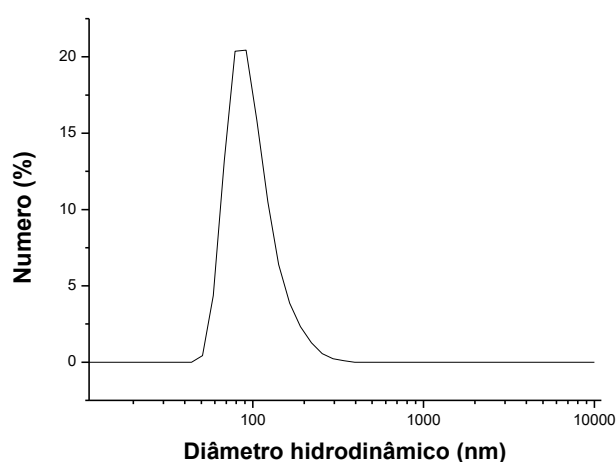
Os diâmetros hidrodinâmicos (*Z-average*) das AgNPs sintetizadas a partir dos extratos de células frescas e secas da *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) na temperatura de 75 °C foram de  $148,8 \pm 1,3$  nm e  $148,6 \pm 0,9$  nm, respectivamente. Portanto, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) no tamanho das nanopartículas produzidas a partir dos dois extratos. O diâmetro hidrodinâmico de partículas em suspensão é estabelecido pelo espalhamento de luz decorrente do movimento browniano (aleatório) das partículas e inclui a camada de solvatação presente na superfície da partícula. (MALVERN, 2004).

A FIGURA 16 evidencia a distribuição do diâmetro hidrodinâmico (*Z-average*), em número, das nanopartículas sintetizadas com o extrato de células frescas da *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) na temperatura de 75 °C. Os resultados obtidos com o extrato de células secas na temperatura de 75 °C foram semelhantes e, por isso, não foram apresentados. A curva obtida demonstra que apenas uma população de AgNPs foi sintetizada.

A homogeneidade de dimensão das AgNPs sintetizadas também foi verificada por meio do índice de polidispersividade (Pdl). Valores de Pdl próximos de zero ou de um, limites mínimo e máximo da escala de Pdl, indicam partículas monodispersas e polidispersas, respectivamente. (MURDOCK et al., 2008). Os valores de Pdl obtidos de  $0,111 \pm 0,008$  e de  $0,132 \pm 0,022$  para as AgNPs formadas com os extratos de

células frescas e secas da *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™), respectivamente, indicam que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nos valores de Pdl das AgNPs sintetizadas a partir de ambos os extratos. Além disso, estes valores de Pdl demonstram ainda que as nanopartículas sintetizadas apresentaram tamanhos bastante homogêneos.

FIGURA 16 - DISTRIBUIÇÃO DOS DIÂMETROS HIDRODINÂMICOS EM NÚMERO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS A PARTIR DOS EXTRATOS DE CÉLULAS FRESCAS DA ARCHAEA *Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) NA TEMPERATURA DE 75 °C

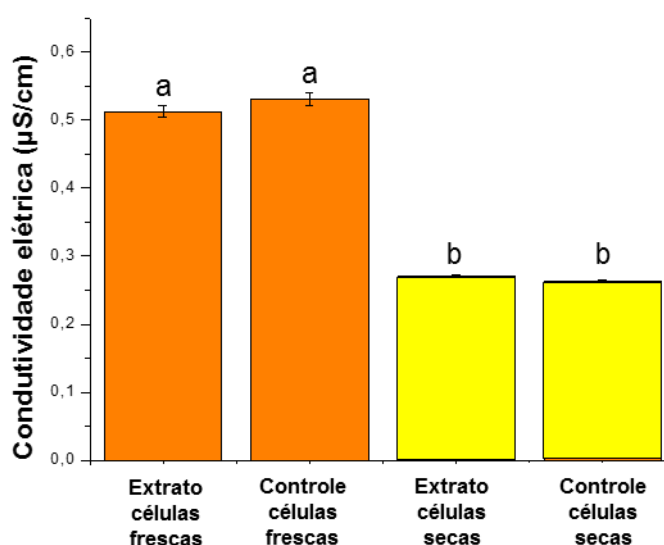


FONTE: O autor (2016).

A estabilidade da suspensão de AgNPs pode ser verificada pela carga de superfície das nanopartículas determinada por meio do potencial Zeta. Diversos autores afirmam que a estabilidade de dispersões coloidais é alcançada em valores de potencial Zeta superiores a  $\pm 30$  mV, indicando que as forças repulsivas entre as partículas são suficientes para evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes. (BUSZEWSKI et al., 2016; POMASTOWSKI, SPRYNSKYY e BUSZEWSKI, 2014; SCHAFFAZICK et al., 2003). Os valores de potencial Zeta obtidos para as nanopartículas sintetizadas a 75 °C utilizando os extratos de células frescas e secas da *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) foram de  $-32,5 \pm 0,9$  mV e  $-36,3 \pm 0,5$  mV, respectivamente, e, portanto, apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ), ainda que dentro da mesma faixa de estabilidade. Estes valores indicam que as AgNPs sintetizadas eram negativamente carregadas, devido ao valor negativo do potencial Zeta, e apresentavam estabilidade coloidal moderada em suspensão devido ao valor superior a 30 mV.

Segundo Bonatto e Silva (2014), a condutividade elétrica foi relacionada à formação das AgNPs e, por isso, pode contribuir com a sua caracterização. A FIGURA 17 retrata os valores de condutividade elétrica obtidos após a síntese das AgNPs empregando os extratos de células frescas e secas da *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) na temperatura de 75 °C.

FIGURA 17 - CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS NA TEMPERATURA DE 75 °C A PARTIR DOS EXTRATOS DE CÉLULAS FRESCAS E SECAS DA ARCHAEA *Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™)



FONTE: O autor (2016).

NOTA: As barras mostram a média  $\pm$  desvio padrão. As mesmas letras sob as barras representam nenhuma diferença estatística (teste *t* de Student,  $p > 0,05$ ).

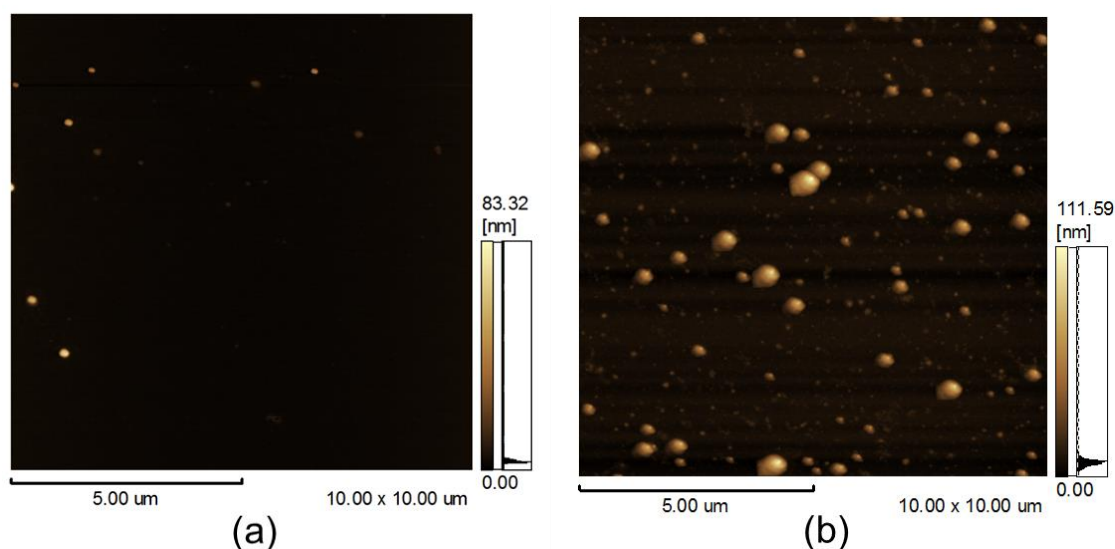
Os valores de condutividade elétrica obtidos nas misturas reacionais dos extratos de células frescas e secas em relação aos seus respectivos controles não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Isto demonstra que a condutividade elétrica não pode ser atribuída às AgNPs, mas deve ser decorrente da presença de outros componentes nas misturas reacionais, oriundos do micro-organismo.

Para avaliar o tamanho (diâmetro seco) e a morfologia das AgNPs sintetizadas a partir dos extratos de células frescas e secas da *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™), foram obtidas imagens por microscopia de força atômica (FIGURA 18).

Nas imagens obtidas por microscopia de força atômica, foi possível verificar que as AgNPs sintetizadas tanto a partir dos extratos de células frescas quanto de células secas apresentaram formato esférico. Porém, as imagens mostram que

aquelas provenientes dos extratos de células frescas apresentam diâmetro seco (altura) menor quando comparadas àquelas obtidas do extrato de células secas, o que foi confirmado pelos dados obtidos da medida da altura das nanopartículas e é apresentado nos histogramas da FIGURA 19.

FIGURA 18 - IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS NA TEMPERATURA DE 75 °C A PARTIR DOS EXTRATOS DE CÉLULAS FRESCAS (a) E SECAS (b) DA *ARCHAEA Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™)



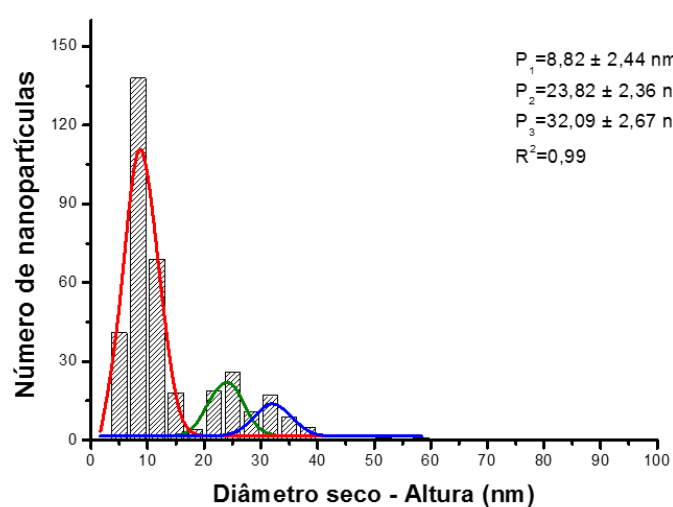
FONTE: O autor (2016).

Três subpopulações distintas de AgNPs foram verificadas após a síntese a partir dos extratos de células frescas e secas. As subpopulações de AgNPs provenientes dos extratos de células frescas apresentaram menores diâmetros secos (altura), de  $8,82 \pm 2,44$  nm,  $23,82 \pm 2,36$  nm e  $32,09 \pm 2,67$  nm, do que as subpopulações derivadas dos extratos de células secas. Os diâmetros (alturas) das nanopartículas fornecidos pela microscopia de força atômica foram menores do que os diâmetros hidrodinâmicos porque nestes existe a contribuição da camada de solvatação existente na superfície das nanopartículas em suspensão. (CAMLI et al., 2010). O tamanho e a morfologia das AgNPs apresentam influência na sua toxicidade. As AgNPs menores demonstram maior atividade antimicrobiana quando comparadas às AgNPs maiores. (OLUWAFEMI et al., 2013; TAVAF et al., 2015).

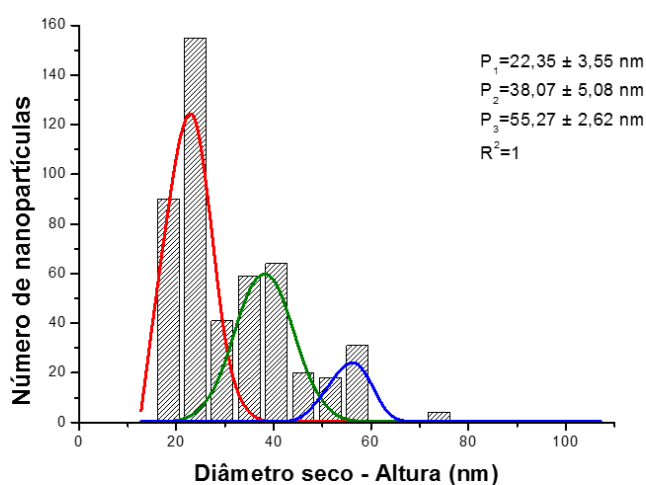
A síntese verde de AgNPs a partir de fontes biológicas envolve a participação de substâncias capazes de formar e estabilizar as nanopartículas por meio da redução

dos íons metálicos. A investigação dos perfis dos componentes moleculares presentes nos extratos de células frescas e secas da *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) possivelmente envolvidos na síntese das AgNPs foi realizada por espectrometria de massa MALDI-TOF. A FIGURA 20 apresenta os espectros de massa das amostras utilizadas na síntese das nanopartículas.

FIGURA 19 - DISTRIBUIÇÃO DO DIÂMETRO SECO (ALTURA), OBTIDO POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA, DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS COM OS EXTRATOS DE CÉLULAS FRESCAS (a) E SECAS (b) DA ARCHAEA *Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) NA TEMPERATURA DE 75 °C



(a)

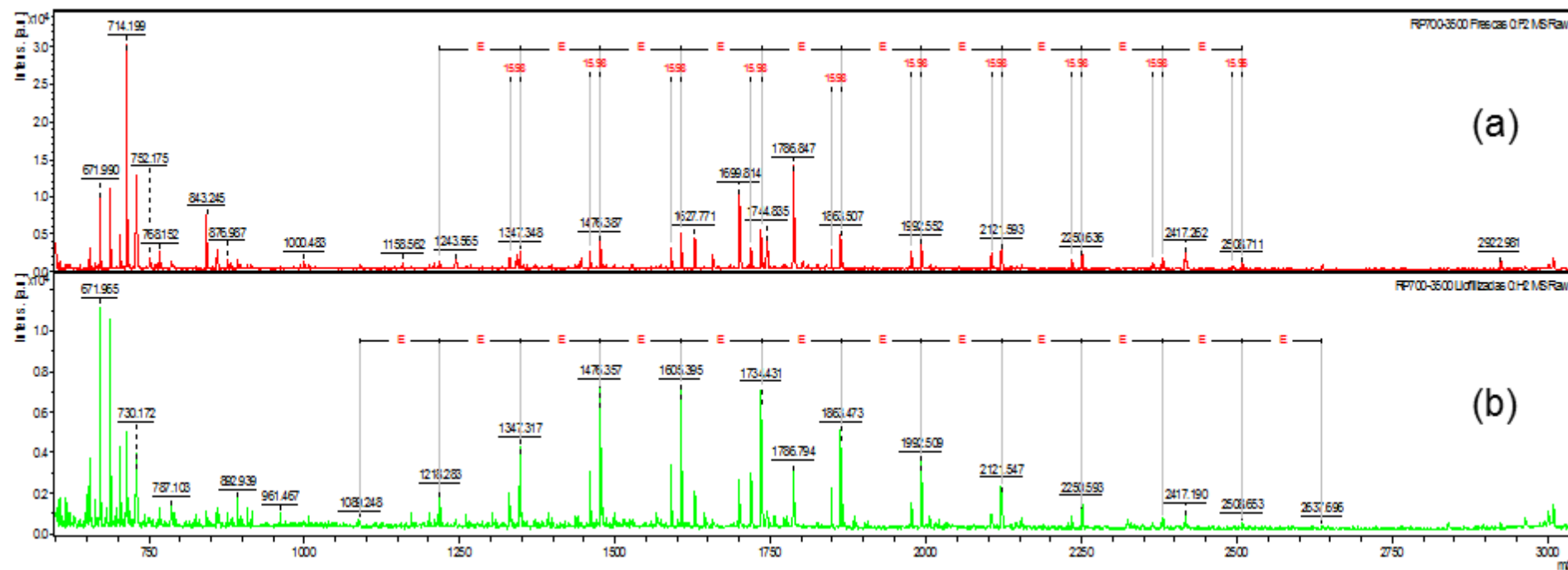


(b)

FONTE: O autor (2016).

NOTA:  $P_1$ ,  $P_2$  e  $P_3$  se referem ao diâmetro seco (altura), em nm, das populações 1, 2 e 3 de nanopartículas de prata, respectivamente, nas misturas reacionais.

FIGURA 20 - ESPECTROS DE MASSA MALDI-TOF OBTIDOS DOS EXTRATOS DE CÉLULAS FRESCAS (a) E SECAS (b) DA ARCHAEA *Halorubrum saccharovororum*



FONTE: O autor (2016).

Nos espectros de massa, íons na região de  $m/z$  1050 a 2650, com intervalos de  $m/z$  de 129, são indicativos da presença de substâncias poliglutâmicas. Estas substâncias podem ser provenientes da parede celular da *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) visto que a parede celular das *Archaea* halofílicas é composta por glicoproteínas que apresentam alto teor dos aminoácidos ácidos (de carga negativa) como os resíduos de aspártico e glutâmico (MADIGAN et al., 2012b). As substâncias poliglutâmicas podem apresentar carga negativa e podem estar envolvidas com a estabilização das AgNPs sintetizadas.

Os extratos de células frescas e secas da *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) foram capazes de originar e estabilizar, por meio de seus constituintes, as AgNPs produzidas no presente estudo. Na literatura, foram encontrados somente dois estudos sobre a síntese de AgNPs empregando *Archaea* halofílicas e ambos foram desenvolvidos pelo mesmo grupo de pesquisadores. Srivastava et al. (2013) realizaram a síntese intracelular de AgNPs utilizando a *Archaea Halococcus salifodinae* BK3. As nanopartículas foram sintetizadas nos meios de cultivo NTYE (NaCl, triptona e extrato de levedura) e HNB (caldo nitrato halofílico), apresentaram formato predominantemente esférico e tamanho médio de 50,3 nm e de 12 nm, respectivamente. As nanopartículas sintetizadas exibiram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. Srivastava et al. (2014) sintetizaram AgNPs nas mesmas condições, empregando outra *Archaea*, *Halococcus salifodinae* BK6, e obtiveram nanopartículas com as mesmas características e atividades antimicrobianas. Desta forma, as AgNPs sintetizadas a partir das *Archaea Halococcus salifodinae* BK3 e BK6 são promissoras como agentes antimicrobianos. Espera-se que as AgNPs sintetizadas com extratos da *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) também possam ser utilizadas como agentes antimicrobianos, porém estudos complementares, como a atividade antimicrobiana frente a bactérias e/ou leveduras, devem ser realizados para confirmar as suas propriedades biológicas.

## 6 CONCLUSÃO

A estratégia de otimização utilizada, além da informação sobre os efeitos das variáveis significativas no crescimento e na produção de carotenoides pela *Archaea* halofílica *Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™), forneceu os valores ótimos das variáveis concentração de cloreto de sódio, valor inicial de pH e temperatura para a produção das máximas concentrações de células e de carotenoides. Desta forma, a *Archaea* produziu a maior concentração celular de  $4,42 \pm 0,56 \text{ g.L}^{-1}$  e de carotenoides totais de  $670,27 \pm 19,62 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$  de células secas nas concentrações de cloreto de sódio de 26,4% e 9,6% (p/v), valores de pH inicial de 9,2 e 6,7 e temperaturas de 50,1 °C e 35,8 °C, respectivamente. A concentração celular e a concentração de carotenoides obtidas evidenciam que a estratégia de otimização foi bem-sucedida, representando aumento de 2,7 e 8,7 vezes, respectivamente, no crescimento e na produção de carotenoides pela *Archaea*.

Em relação às nanopartículas de prata, os extratos de células frescas e secas da *Archaea Halorubrum saccharovorum* (ATCC® 29252™) foram capazes de promover a síntese e a estabilização de AgNPs esféricas na temperatura de 75 °C. A formação e estabilização das AgNPs parecem não estar relacionadas com a presença dos carotenoides, mas sim com outros constituintes da *Archaea*. As AgNPs produzidas apresentaram diâmetros hidrodinâmicos de cerca de 148 nm, diâmetros secos entre cerca de 8 nm e 56 nm, tamanhos homogêneos, cargas negativas e moderada estabilidade coloidal. Desta forma, as AgNPs sintetizadas demonstram características adequadas para o seu emprego como agentes antimicrobianos, após a confirmação desta propriedade, e podem contribuir com uma fonte alternativa de nanopartículas metálicas.



## REFERÊNCIAS

- AHMED, S.; ANNU; IKRAM, S.; YUDHA S, S. Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 161, p. 141-153, 2016.
- ALBERNAZ, V. L. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico**. 121 p. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nabobiotecnologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- AMENDOLA, V.; BAKR, O. M.; STELLACCI, F. A study of the surface plasmon resonance of silver nanoparticles by the discrete dipole approximation method: effect of shape, size, structure, and assembly. **Plasmonics**, v. 5, n. 1, p. 85-97, 2010.
- ARAGÃO, A. P. D.; OLIVEIRA, T. M. D.; QUELEMES, P. V.; PERFEITO, M. L. G.; ARAÚJO, M. C.; SANTIAGO, J. D. A. S.; CARDOSO, V. S.; QUARESMA, P.; LEITE, J. R. D. S. D. A.; SILVA, D. A. D. Green synthesis of silver nanoparticles using the seaweed *Gracilaria birdiae* and their antibacterial activity. **Arabian Journal of Chemistry**, 2016. No prelo.
- ASKER, D.; AWAD, T.; OHTA, Y. Lipids of *Haloferax alexandrinus* strain TM<sup>T</sup>: an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n. 1, p. 37-43, 2002.
- ASKER, D.; OHTA, Y. Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 6, p. 617-621, 1999.
- ATCC - American Type Culture Collection. Disponível em: <<http://www.atcc.org/Attachments/4067.pdf>>. Acesso em: 26/08/2011.
- BAKER, S.; RAKSHITH, D.; KAVITHA, K. S.; SANTOSH, P.; KAVITHA, H. U.; RAO, Y.; SATISH, S. Plants: emerging as nanofactories towards facile route in synthesis of nanoparticles. **BiolImpacts**, v. 3, n. 3, p. 111-117, 2013.
- BCC RESEARCH. The global market for carotenoids. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-global-market-report-fod025e.html>>. Acesso em: 16 out. 2016.
- BHOSALE, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 4, p. 351-61, 2004.
- BIDLE, K. A.; HANSON, T. E.; HOWELL, K.; NANNEN, J. HMG-CoA reductase is regulated by salinity at the level of transcription in *Haloferax volcanii*. **Extremophiles**, v. 11, n. 1, p. 49-55, 2007.
- BIER, O. **Bacteriologia e imunologia**. São Paulo: Melhoramentos, 1980.

BOLHUIS, H.; POELE, E. M. T.; RODRIGUEZ-VALERA, F. Isolation and cultivation of Walsby's square archaeon. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1287-1291, 2004.

BONATTO, C. C.; SILVA, L. P. Higher temperatures speed up the growth and control the size and optoelectrical properties of silver nanoparticles greenly synthesized by cashew nutshells. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 46-54, 2014.

BOWERS, K.; WIEGEL, J. Temperature and pH optima of extremely halophilic archaea: a mini-review. **Extremophiles**, v. 15, n. 2, p. 119-128, 2011.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB Journal**, v. 9, n. 15, p. 1551-8, 1995a.

BRITTON, G. UV/Visible spectroscopy. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. **Carotenoids Volume 1B: spectroscopy**. Basel: Birkhäuser, 1995b. p.13-62.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Carotenoids today and challenges for the future. In: \_\_\_\_\_. **Carotenoids. Volume 1A: isolation and analysis**. Basel: Birkhäuser, 1995. p.13-26.

BUSZEWSKI, B.; RAFIŃSKA, K.; POMASTOWSKI, P.; WALCZAK, J.; ROGOWSKA, A. Novel aspects of silver nanoparticles functionalization. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 506, p. 170-178, 2016.

CALEGARI-SANTOS, R. **Obtenção de carotenoides utilizando a bactéria *Halorubrum saccharovorum* (Archaea)**. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

CALEGARI-SANTOS, R.; DIOGO, R. A.; FONTANA, J. D.; BONFIM, T. M. B. Carotenoid production by halophilic archaea under different culture conditions. **Current Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 641-651, 2016.

CALO, D.; EICHLER, J. Crossing the membrane in Archaea, the third domain of life. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1808, n. 3, p. 885-891, 2011.

CALO, P.; DE MIGUEL, T.; SIEIRO, C.; VELAZQUEZ, J. B.; VILLA, T. G. Ketocarotenoids in halobacteria: 3-hydroxy-echinenone and *trans*-astaxanthin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 282-285, 1995.

CAMLI, S. T.; BUYUKSERIN, F.; BALCI, O.; BUDAK, G. G. Size controlled synthesis of sub-100 nm monodisperse poly(methylmethacrylate) nanoparticles using surfactant-free emulsion polymerization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 344, n. 2, p. 528-532, 2010.

CATALOGUE OF LIFE. Disponível em: <<http://www.catalogueoflife.org/>>. Acesso em: 19/03/2012.

CHAPMAN, M. S. Vitamin A: History, Current Uses, and Controversies. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 31, n. 1, p. 11-16, 2012.

COWAN, D. A. Biotechnology of the Archaea. **Trends in Biotechnology**, v. 10, p. 315-323, 1992.

D'SOUZA, S. E.; ALTEKAR, W.; D'SOUZA, S. F. Adaptive response of *Haloferax mediterranei* to low concentrations of NaCl (< 20%) in the growth medium. **Archives of Microbiology**, v. 168, n. 1, p. 68-71, 1997.

DAVIES, B. H. Carotenoids. In: GOODWIN, T. W. **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. London: Academic Press, 1976. p.38-165.

DESMARAIS, D.; JABLONSKI, P. E.; FEDARKO, N. S.; ROBERTS, M. F. 2-Sulfotrehalose, a novel osmolyte in haloalkaliphilic archaea. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 10, p. 3146-53, 1997.

DUMMER, A. M.; BONSALL, J. C.; CIHLA, J. B.; LAWRY, S. M.; JOHNSON, G. C.; PECK, R. F. Bacterioopsin-mediated regulation of bacterioruberin biosynthesis in *Halobacterium salinarum*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 20, p. 5658-5667, 2011.

EL-SAYED, W. S. M.; TAKAICHI, S.; SAIDA, H.; KAMEKURA, M.; ABU-SHADY, M.; SEKI, H.; KUWABARA, T. Effects of light and low oxygen tension on pigment biosynthesis in *Halobacterium salinarum*, revealed by a novel method to quantify both retinal and carotenoids. **Plant and Cell Physiology**, v. 43, n. 4, p. 379-383, 2002.

EVANS, R. W.; KUSHWAHA, S. C.; KATES, M. The lipids of *Halobacterium marismortui*, an extremely halophilic bacterium in the dead sea. **Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 619, n. 3, p. 533-544, 1980.

FALB, M.; MÜLLER, K.; KÖNIGSMAIER, L.; OBERWINKLER, T.; HORN, P.; GRONAU, S. V.; GONZALEZ, O.; PFEIFFER, F.; BORNBERG-BAUER, E.; OESTERHELT, D. Metabolism of halophilic archaea. **Extremophiles**, v. 12, n. 2, p. 177-196, 2008.

FANG, C.-J.; KU, K.-L.; LEE, M.-H.; SU, N.-W. Influence of nutritive factors on C<sub>50</sub> carotenoids production by *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 with two-stage cultivation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 16, p. 6487-6493, 2010.

FENDRIHAN, S.; LEGAT, A.; PFAFFENHUEMER, M.; GRUBER, C.; WEIDLER, G.; GERBL, F.; STAN-LOTTER, H. Extremely halophilic archaea and the issue of long-term microbial survival. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 5, n. 2-3, p. 203-218, 2006.

GOCHNAUER, M. B.; KUSHWAHA, S. C.; KATES, M.; KUSHNER, D. J. Nutritional control of pigment and isoprenoid compound formation in extremely halophilic bacteria. **Archiv fur Mikrobiologie**, v. 84, n. 4, p. 339-349, 1972.

HAMIDI, M.; ABDIN, M. Z.; NAZEMYIEH, H.; HEJAZI, M. A.; HEJAZI, M. S. Optimization of total carotenoid production by *Halorubrum* sp. TBZ126 using response

surface methodology. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v. 6, n. 5, p. 286-294, 2014.

HEIDER, S. A. E.; PETERS-WENDISCH, P.; WENDISCH, V. F.; BEEKWILDER, J.; BRAUTASET, T. Metabolic engineering for the microbial production of carotenoids and related products with a focus on the rare C50 carotenoids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 10, p. 4355-4368, 2014.

HERNÁNDEZ-ALMANZA, A.; MONTAÑEZ, J.; MARTÍNEZ, G.; AGUILAR-JIMÉNEZ, A.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; AGUILAR, C. N. Lycopene: Progress in microbial production. **Trends in Food Science & Technology**, v. 56, p. 142-148, 2016.

HU, Z.-C.; ZHENG, Y.-G.; WANG, Z.; SHEN, Y.-C. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 586-590, 2006.

HULKOTI, N. I.; TARANATH, T. C. Biosynthesis of nanoparticles using microbes—A review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 121, p. 474-483, 2014.

KALPANA, D.; LEE, Y. S. Synthesis and characterization of bactericidal silver nanoparticles using cultural filtrate of simulated microgravity grown *Klebsiella pneumoniae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 3, p. 151-156, 2013.

KELLY, M.; LIAAEN-JENSEN, S. Bacterial carotenoids. XXVI. C<sub>50</sub>-carotenoids. 2. Bacterioruberin. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 21, n. 9, p. 2578-2580, 1967.

KELLY, M.; NORGÅRD, S.; LIAAEN-JENSEN, S. Bacterial carotenoids. XXXI. C<sub>50</sub>-carotenoids 5. Carotenoids of *Halobacterium salinarum*, especially bacterioruberin. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 24, n. 6, p. 2169-2182, 1970.

KORANY, M. A.; RAGAB, M. A. A.; YOUSSEF, R. M.; AFIFY, M. A. Experimental design and machine learning strategies for parameters screening and optimization of Hantzsch condensation reaction for the assay of sodium alendronate in oral solution. **RSC Advances**, v. 5, n. 9, p. 6385-6394, 2015.

KUMAR, B.; SMITA, K.; DEBUT, A.; CUMBAL, L. Extracellular green synthesis of silver nanoparticles using Amazonian fruit Araza (*Eugenia stipitata* McVaugh). **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 26, n. 9, p. 2363-2371, 2016.

KUSHNER, D. J. Growth and nutrition of halophilic bacteria. In: VREELAND, R. H.; HOCHSTEIN, L. I. **The Biology of Halophilic Bacteria**. Boca Raton: CRC Press, 1992. p.87-104.

KUSHWAHA, S. C.; GOCHNAUER, M. B.; KUSHNER, D. J.; KATES, M. Pigments and isoprenoid compounds in extremely and moderately halophilic bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 241-245, 1974.

KUSHWAHA, S. C.; JUEZ-PÉREZ, G.; RODRIGUEZ-VALERA, F.; KATES, M.; KUSHNER, D. J. Survey of lipids of a new group of extremely halophilic bacteria from

salt ponds in Spain. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 28, n. 12, p. 1365-1372, 1982.

KUSHWAHA, S. C.; KATES, M. Effect of glycerol on carotenogenesis in the extreme halophile, *Halobacterium cutirubrum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 25, n. 11, p. 1288-1291, 1979.

KUSHWAHA, S. C.; KRAMER, J. K. G.; KATES, M. Isolation and characterization of C<sub>50</sub>-carotenoid pigments and other polar isoprenoids from *Halobacterium cutirubrum*. **Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 398, n. 2, p. 303-314, 1975.

KUSHWAHA, S. C.; PUGH, E. L.; KRAMER, J. K. G.; KATES, M. Isolation and identification of dehydrosqualene and C<sub>40</sub>-carotenoid pigments in *Halobacterium cutirubrum*. **Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 260, n. 3, p. 492-506, 1972.

LAZRAK, T.; WOLFF, G.; ALBRECHT, A.-M.; NAKATANI, Y.; OURISSON, G.; KATES, M. Bacterioruberins reinforce reconstituted *Halobacterium* lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 939, n. 1, p. 160-162, 1988.

LIU, Y.-S.; WU, J.-Y.; HO, K.-P. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, n. 3, p. 331-335, 2006.

LIU, Y. S.; WU, J. Y. Optimization of cell growth and carotenoid production of *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experiment design. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, n. 2, p. 182-189, 2007.

LOBASSO, S.; LOPALCO, P.; MASCOLO, G.; CORCELLI, A. Lipids of the ultra-thin square halophilic archaeon *Haloquadratum walsbyi*. **Archaea**, v. 2, n. 3, p. 177-183, 2008.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D. A.; CLARK, D. P. *Archaea*. In: \_\_\_\_\_. **Brock biology of microorganisms**. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2012a. p.556-583.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D. A.; CLARK, D. P. Cell structure and function in *Bacteria* and *Archaea*. In: \_\_\_\_\_. **Brock biology of microorganisms**. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2012b. p.47-84.

MALVERN. Zetasizer Nano Series user manual. Disponível em: <[http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer\\_Nano\\_user\\_manual\\_Man0317-1.1.pdf](http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf)>. Acesso em: 09 set. 2016.

MANDELLI, F.; MIRANDA, V. S.; RODRIGUES, E.; MERCADANTE, A. Z. Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1781-1790, 2012.

MANIKANDAN, M.; PAŠIĆ, L.; KANNAN, V. Optimization of growth media for obtaining high-cell density cultures of halophilic archaea (family *Halobacteriaceae*) by response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 12, p. 3107-3112, 2009.

MATSUMI, R.; ATOMI, H.; DRIESSEN, A. J. M.; OOST, J. V. D. Isoprenoid biosynthesis in Archaea – biochemical and evolutionary implications. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 39-52, 2011.

MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS. Disponível em: <<http://www.aliceweb.mdic.gov.br/>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. New York: Wiley, 2001.

MURDOCK, R. C.; BRAYDICH-STOLLE, L.; SCHRAND, A. M.; SCHLAGER, J. J.; HUSSAIN, S. M. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to *in vitro* exposure using dynamic light scattering technique. **Toxicological Sciences**, v. 101, n. 2, p. 239-253, 2008.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**. Hoboken: Wiley, 2009.

NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 156, n. 1–2, p. 1-13, 2010.

NETO, B. D. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como variar tudo ao mesmo tempo. In: \_\_\_\_\_. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Porto Alegre: Bookman, 2010. p.99-144.

NISHINO, H.; MURAKOSHI, M.; TOKUDA, H.; SATOMI, Y. Cancer prevention by carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 483, n. 2, p. 165-168, 2009.

OLUWAFEMI, O. S.; VUYELWA, N.; SCRIBA, M.; SONGCA, S. P. Green controlled synthesis of monodispersed, stable and smaller sized starch-capped silver nanoparticles. **Materials Letters**, v. 106, p. 332-336, 2013.

OREN, A. Biotechnological applications and potentials of halophilic microorganisms. In: \_\_\_\_\_. **Halophilic microorganisms and their environments**. Netherlands: Kluwer, 2002a. p.357-388.

OREN, A. Halophilic Microorganisms in their Natural Environment and in Culture — an Historical Introduction  
In: \_\_\_\_\_. **Halophilic Microorganisms and their Environments**. Netherlands: Kluwer, 2002b. p.3-16.

OREN, A. Pigments of halophilic microorganisms. In: \_\_\_\_\_. **Halophilic microorganisms and their environments**. Netherlands: Kluwer, 2002c. p.173-206.

OREN, A. The Order Halobacteriales. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes**. New York: Springer, 2006. p.113-164.

OREN, A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. **Saline Systems**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2008.

OTARI, S. V.; PATIL, R. M.; NADAF, N. H.; GHOSH, S. J.; PAWAR, S. H. Green biosynthesis of silver nanoparticles from an actinobacteria *Rhodococcus* sp. **Materials Letters**, v. 72, p. 92-94, 2012.

OTARI, S. V.; PATIL, R. M.; NADAF, N. H.; GHOSH, S. J.; PAWAR, S. H. Green synthesis of silver nanoparticles by microorganism using organic pollutant: its antimicrobial and catalytic application. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 2, p. 1503-1513, 2014.

PAPAIIOANNOU, E. H.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Substrate contribution on carotenoids production in *Blakeslea trispora* cultivations. **Food and Bioprocess Processing**, v. 88, n. 2–3, p. 305-311, 2010.

PFANDER, H. C<sub>45</sub>- and C<sub>50</sub>-carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n. 10-11, p. 2369-2374, 1994.

PHONGTONGPASUK, S.; POADANG, S.; YONGVANICH, N. Environmental-friendly Method for Synthesis of Silver Nanoparticles from Dragon Fruit Peel Extract and their Antibacterial Activities. **Energy Procedia**, v. 89, p. 239-247, 2016.

POMASTOWSKI, P.; SPRYNSKYY, M.; BUSZEWSKI, B. The study of zinc ions binding to casein. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 120, p. 21-27, 2014.

QUILLAGUAMÁN, J.; GUZMÁN, H.; VAN-THUOC, D.; HATTI-KAUL, R. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1687-1696, 2010.

RIVERA, S. M.; CANELA-GARAYOA, R. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. **Journal of Chromatography A**, v. 1224, p. 1-10, 2012.

ROBINSON, J. L.; PYZYNA, B.; ATRASZ, R. G.; HENDERSON, C. A.; MORRILL, K. L.; BURD, A. M.; DESOUCY, E.; FOGLEMAN, R. E.; NAYLOR, J. B.; STEELE, S. M.; ELLIOTT, D. R.; LEYVA, K. J.; SHAND, R. F. Growth kinetics of extremely halophilic *Archaea* (family *Halobacteriaceae*) as revealed by Arrhenius plots. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 3, p. 923-929, 2005.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos**. Campinas: Casa do Pão, 2005.

RODRIGUEZ-VALERA, F.; RUIZ-BERRAQUERO, F.; RAMOS-CORMENZANA, A. Short communication: isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined

inorganic media with single carbon sources. **Journal of General Microbiology**, v. 119, n. 2, p. 535-538, 1980.

RØNNEKLEIV, M.; LENES, M.; NORGÅRD, S.; LIAAEN-JENSEN, S. Three dodecaene C<sub>50</sub>-carotenoids from halophilic bacteria. **Phytochemistry**, v. 39, n. 3, p. 631-634, 1995.

RØNNEKLEIV, M.; LIAAEN-JENSEN, S. Bacterial carotenoids. 52. C<sub>50</sub>-carotenoids. 22. Naturally occurring geometrical isomers of bacterioruberin. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 46, p. 1092-1095, 1992.

RØNNEKLEIV, M.; LIAAEN-JENSEN, S. Bacterial carotenoids 53, C<sub>50</sub>-carotenoids 23; Carotenoids of *Haloferax volcanii* versus other halophilic bacteria. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 23, n. 6, p. 627-634, 1995.

ROY, N.; GAUR, A.; JAIN, A.; BHATTACHARYA, S.; RANI, V. Green synthesis of silver nanoparticles: An approach to overcome toxicity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 807-812, 2013.

SÁNCHEZ BLANCO, A.; PALACIOS DURIVE, O.; BATISTA PÉREZ, S.; DÍAZ MONTES, Z.; PÉREZ GUERRA, N. Simultaneous production of amylases and proteases by *Bacillus subtilis* in brewery wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 665-674, 2016.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. D. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SCHIRALDI, C.; GIULIANO, M.; DE ROSA, M. Perspectives on biotechnological applications of archaea. **Archaea**, v. 1, n. 2, p. 75-86, 2002.

SCHMIDT, I.; SCHEWE, H.; GASSEL, S.; JIN, C.; BUCKINGHAM, J.; HÜMBELIN, M.; SANDMANN, G.; SCHRADER, J. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma*/*Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 555-571, 2011.

SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, n. 1-2, p. 83-96, 2009.

SINGH, O. V.; GABANI, P. Extremophiles: radiation resistance microbial reserves and therapeutic implications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 4, p. 851-861, 2011.

SINGH, P.; KIM, Y.-J.; ZHANG, D.; YANG, D.-C. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 588-599, 2016.



SRIVASTAVA, P.; BRAGANCA, J.; RAMANAN, S. R.; KOWSHIK, M. Synthesis of silver nanoparticles using haloarchaeal isolate *Halococcus salifodinae* BK3. **Extremophiles**, v. 17, n. 5, p. 821-31, 2013.

SRIVASTAVA, P.; BRAGANCA, J.; RAMANAN, S. R.; KOWSHIK, M. Green synthesis of silver nanoparticles by haloarchaeon *Halococcus salifodinae* BK6. **Advanced Materials Research**, v. 938, p. 236-241, 2014.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. Aeration and agitation. In: \_\_\_\_\_. **Principles of fermentation technology** Amsterdam: Pergamon, 1995. p.243-275.

STIEHL, T.; RULLKÖTTER, J.; NISSENBAUM, A. Molecular and isotopic characterization of lipids in cultured halophilic microorganisms from the Dead Sea and comparison with the sediment record of this hypersaline lake. **Organic Geochemistry**, v. 36, n. 9, p. 1242-1251, 2005.

SUI, L.; LIU, L.; DENG, Y. Characterization of halophilic C<sub>50</sub> carotenoid-producing archaea isolated from solar saltworks in Bohai Bay, China. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 32, n. 6, p. 1280-1287, 2014.

SUNKAR, S.; NACHIYAR, C. V. Green synthesis of silver nanoparticles using *Bacillus cereus*, an endophytic bacterium isolated from *Garcinia xanthochymus*. Nanoscience, Engineering and Technology (ICONSET), 2011 International Conference on. 28-30 Nov. 2011, 2011. 381-385 p.

TALEKAR, S.; JOSHI, A.; CHOUGLE, R.; NAKHE, A.; BHOJWANI, R. Immobilized enzyme mediated synthesis of silver nanoparticles using cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of NADH-dependent nitrate reductase. **Nano-Structures & Nano-Objects**, v. 6, p. 23-33, 2016.

TAVAF, Z.; TABATABAEI, M.; KHALAFI-NEZHAD, A.; PANAHI, F.; HOSSEINI, A. Green synthesis of silver nanoparticles by reduced glycated casein adducts: Assessment of their antibacterial and antioxidant activity against *Streptococcus mutans*. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 7, n. 3, p. 294-302, 2015.

TOLAYMAT, T. M.; EL BADAWY, A. M.; GENAIDY, A.; SCHECKEL, K. G.; LUXTON, T. P.; SUIDAN, M. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 5, p. 999-1006, 2010.

TOMLINSON, G. A.; HOCHSTEIN, L. I. Isolation of carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 698-701, 1972.

TOMLINSON, G. A.; HOCHSTEIN, L. I. *Halobacterium saccharovorum* sp. nov., a carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 587-591, 1976.

TORNABENE, T. G.; KATES, M.; GELPI, E.; ORO, J. Occurrence of squalene, di- and tetrahydrosqualenes, and vitamin MK<sub>8</sub> in an extremely halophilic bacterium, *Halobacterium cutirubrum*. **Journal of Lipid Research**, v. 10, n. 3, p. 294-303, 1969.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Classificação dos micro-organismos. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012a. p.273-298.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Observando micro-organismos através do microscópio. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012b. p.54-75.

VACHALI, P.; BHOSALE, P.; BERNSTEIN, P. S. Microbial carotenoids. In: BARREDO, J.-L. **Microbial Carotenoids from Fungi: methods and protocols**. New York: Springer, 2012. p.41-59.

VÍLCHEZ, C.; FORJÁN, E.; CUARESMA, M.; BÉDMAR, F.; GARBAYO, I.; VEGA, J. M. Marine Carotenoids: Biological Functions and Commercial Applications. **Marine Drugs**, v. 9, n. 3, p. 319-333, 2011.

YANG, Y.; YATSUNAMI, R.; ANDO, A.; MIYOKO, N.; FUKUI, T.; TAKAICHI, S.; NAKAMURA, S. Complete biosynthetic pathway of the C<sub>50</sub> carotenoid bacterioruberin from lycopene in the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 9, p. 1614-1623, 2015.

YOU, H.; FANG, J. Particle-mediated nucleation and growth of solution-synthesized metal nanocrystals: A new story beyond the LaMer curve. **Nano Today**, v. 11, n. 2, p. 145-167, 2016.